

**THROMBOZYTENAGGREGATION UND GLYKOSYLIERTE
PROTEINE BEI NORMALPERSONEN UND
INSULINPFLICHTIGEN DIABETIKERN**

Barbara Smolka

Disbui. München

1988



Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr.med. E. Buchborn

Thrombozytenaggregation und glykosylierte Proteine
bei Normalpersonen und insulinpflichtigen Diabetikern

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Barbara Smolka
aus
Erlangen

1987

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. R. Landgraf
Mitberichterstatter : Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 18. 2. 88

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0083

I

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1 Einleitung

1.1	Diabetes und Spätkomplikationen	1
1.2	Thrombozytenaggregation in vivo und in vitro	3
1.3	Thrombozytenaggregation bei Diabetikern	5
1.4	Chemie der MAILLARD - Reaktion	7
1.5	Diabetes und Glykosylierungsreaktion	9
1.6	Ziel der Arbeit	13

2 Thrombozytenaggregation

2.1	Reagenzien	14
2.1.1	Puffer	14
2.1.1.1	Tris-Puffer	14
2.1.1.2	Krebs-Henseleit-Puffer	14
2.1.1.3	Phosphatpuffer	14
2.1.2	ADP	15
2.1.3	Kollagen	16
2.1.4	Arachidonsäure	16
2.2	Methodik	16
2.2.1	Blutabnahme	16
2.2.2	Thrombozytenaufbereitung	17
2.2.2.1	Thrombozytenreiches Plasma	17
2.2.2.2	Thrombozytenarmes Plasma	18
2.2.2.3	Standardisiertes Plasma	19
2.2.3	Aggregometer-Schreiber-Einheit	19
2.2.4	Durchführung der Aggregation	20

II

Seite

2.2.4.1	ADP-induzierte Aggregation	20
2.2.4.2	Kollagen-induzierte Aggregation	22
2.2.4.3	Arachidonsäure-induzierte Aggregation	23
2.3	Statistische Auswertung	25
2.4	Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Faktoren	26
2.4.1	Zeitabhängigkeit	26
2.4.2	Temperaturabhängigkeit	30
2.4.3	Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl	33
2.4.4	Einfluß der Blutabnahmetechnik	34
2.4.5	Zentrifugenvergleich	35
2.4.6	Abhängigkeit von der Aggregantienkonzentration	36
2.4.7	Aggregation in nüchternem und nicht-nüchternem Zustand	41
2.5	Qualitätskontrolle	42

3 Glykosylierte Proteine

3.1	Probensammlung	43
3.2	Prinzip der Bestimmung des glykosylierten Albumins	43
3.2.1	Prinzip der Methode	43
3.2.2	Affinitätschromatographische Trennung	44
3.2.3	Konzentrierung des Chromatographieeluats	45
3.2.4	Säurehydrolyse und Messung von 5-HMF	45
3.3	Abhängigkeit der GSA-Bestimmung von verschiedenen Faktoren	47
3.3.1	Kontrolle der Albuminausbeute mittels ^{51}Cr -Albumin	47
3.3.2	Einfluß des pH der Elutionspuffer auf die Albuminwiederfindung	47

III

	Seite
3.3.3	Einfluß der NaCl-Konzentration des Elutionspuffers auf die Albuminwiederfindung 48
3.3.4	Abhängigkeit der HMF-Bildung von der Proteinkonzentration 49
3.4	Fließschema zur Bestimmung des glykosylierten Albumins 51
3.5	Bestimmung der glykosylierten Serumproteine 53
3.6	Weitere Labormethoden 54
3.6.1	Glykosyliertes Hämoglobin 54
3.6.2	Serumzucker 55
3.6.3	Serumelektrophorese 55
3.6.4	Serumproteinbestimmung 55
3.7	Korrelationsberechnungen 56
3.8	Qualitätskontrolle 64
4	Langzeitstudie
4.1	Versuchsanordnung und Patienten 65
4.1.1	Patientenkollektiv 65
4.1.2	Kontrollpersonen 66
4.1.3	Versuchsablauf 68
4.2	Ergebnisse der Langzeitstudie 69
4.2.1	Stoffwechselparameter: Vergleich zwischen den einzelnen Untersuchungen 69
4.2.1.1	Diabetiker insgesamt 69
4.2.1.2	Diabetiker ohne Spätkomplikationen 70
4.2.1.3	Diabetiker mit Spätkomplikationen 72
4.2.1.4	Normalpersonen 73
4.2.2	Thrombozytenaggregation: Vergleich zwischen den einzelnen Untersuchungen 74

4.2.2.1	Diabetiker insgesamt	74
4.2.2.2	Diabetiker ohne Spätkomplikationen	76
4.2.2.3	Diabetiker mit Spätkomplikationen	77
4.2.2.4	Normalpersonen	79
4.2.3	Vergleich der Diabetikergruppen mit Normalpersonen	81
5	Diskussion	
5.1	Thrombozytenaggregation bei Normalpersonen	85
5.2	Glykosylierte Proteine	87
5.3	Langzeitstudie	92
5.3.1	Thrombozytenaggregation bei Diabetikern	92
5.3.2	Arachidonsäure	94
5.3.3	Einfluß der Einstellung auf die Thrombozytenaggregation	95
6	Zusammenfassung	98
7	Literaturverzeichnis	100

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
GSA	Glykosyliertes Serumalbumin
GSP	Glykosyliertes Serumprotein
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HbA ₁	Glykosyliertes Hämoglobin
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP ₂	Standardisiertes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
TBA	Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure

VI

Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1 : Initiale Schritte der MAILLARD-Reaktion	9
Abb. 2 : Kurvenverläufe nach Aggregationsinduz. mit ADP	21
Abb. 3 : Kurvenbeispiele nach Aggregationsinduz. mit Kollagen	22
Abb. 4 : Kurvenbeispiele nach Aggregationsinduz. mit Arachidonsäure	24
Abb. 5 : Abnahme der Lichttransmission in der Zeit	27
Abb. 6a : Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aufbewahrungstemperatur (ADP)	30
Abb. 6b : Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aufbewahrungstemperatur (Kollagen)	31
Abb. 7 : Einfluß steigender ADP-Konzentration	37
Abb. 8 : Kurvenbeispiele bei verschiedenen ADP-Konzen- trationen	38
Abb. 9 : Einfluß steigender Kollagen-Konzentration	39
Abb. 10 : Kurvenbeispiele bei verschiedenen Kollagen-Konzen- trationen	40
Abb. 11 : HMF-Bildung bei verschiedenen Albumin-Konzen- trationen	50
Abb. 12 : Korrelation zwischen HbA ₁ und glykosyliertem Albumin bei insulinpflichtigen Diabetikern	62
Abb. 13 : Korrelation zwischen Blutglucose und glykosy- liertem Albumin bei insulinpflichtigen Diabetikern	63

1 EINLEITUNG

1.1 Diabetes und Spätkomplikationen

Schon vor Beginn der Insulinära waren diabetische Komplikationen wie Retinopathie oder Proteinurie bekannt (12), doch trugen sie nur zu 14,6 % der Mortalitätsstatistik der Joslin-Klinik zwischen 1894 und 1915 bei. Demgegenüber war das diabetische Coma die weitaus häufigste Todesursache (64 %), zudem spielten Infektionen eine bedeutende Rolle (92).

Nach Einführung der Insulintherapie 1922 durch BANTING und BEST vollzog sich hierin eine grundlegende Änderung: jetzt bestimmt das Ausmaß der Spätkomplikationen zu 74 % das Schicksal der Diabetiker (92). Allgemein wird bei den Gefäßläsionen die diabetesspezifische Mikroangiopathie von der Makroangiopathie unterschieden. Letztere gleicht in Pathogenese und Morphologie der Arteriosklerose der Nichtdiabetiker, setzt jedoch früher ein, schreitet rascher fort und tritt in größerer Ausdehnung auf.

Hauptmanifestationen der Makroangiopathie sind koronare Herzkrankheit, periphere Gefäßverschlüsse und Cerebralsklerose, wobei die Dauer, nicht aber die Schwere des Diabetes einen fördernden Einfluß zeigt (54, 69, 92). Zu den Risikofaktoren, die auch beim Nichtdiabetiker das Arterioskleroserisiko steigern (Hypertonie, Adipositas, Hyperlipoproteinämie), treten diabetesspezifische hinzu wie Hyperglykämie, erhöhte Insulinspiegel (139), endotheliale Dysfunktion (27) und veränderte Hämostase (70).

Im Gegensatz zur weitaus größeren Gruppe der Typ II-Diabetiker ist die Mikroangiopathie bei den Typ I-Diabetikern wesentlich deutlicher ausgeprägt und die Nephropathie in dieser Gruppe die Haupttodesursache (12), die



diabetische Retinopathie häufigste Ursache für Erblindung (12). Die meisten Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen Schweregrad der Mikroangiopathie und den Folgen des Insulinmangels, d.h., einer chronisch erhöhten Blutglucosekonzentration (32, 51, 114, 136, 141). Alle Vertreter dieser metabolischen Theorie fordern deswegen eine möglichst normoglykämische Einstellung mit Selbstkontrolle der Patienten (23, 45, 151).

Die Ursache für die capillären Läsionen in Retina, Glomerulum und vielen anderen Geweben wie Haut und Muskel scheint eine Verdickung der Basalmembran mit zunehmender Permeabilität zu sein. Es ist jedoch noch umstritten, ob der veränderte Basalmembranmetabolismus primär auf genetische Defekte (5, 134, 135) oder auf biochemische Veränderungen des Diabetes zurückzuführen ist (82, 122, 123, 143). Durch die Hyperglykämie werden zahlreiche Störungen verursacht, die von verschiedenen Autoren für die Capillarveränderungen verantwortlich gemacht werden:

- erhöhte Ablagerung von Plasmaproteinen in der Gefäßwand (plasmatische Vaskulose, 109)
- rheologische Störungen: erhöhte Blutviskosität, gesteigerte Aggregation und verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten (98, 99, 150)
- verstärkte Sorbitablagerung (90)
- erhöhte nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen (2, 40, 77, 78, 142).

Neuere Ergebnisse legen eine Beteiligung des hämostatischen Systems zu Beginn oder bei Fortschreiten der vasculären Läsionen nahe, dabei wurde eine Hypercoagulabilität mit erhöhten

Gerinnungsfaktoren und eine verminderte fibrinolytische Aktivität beschrieben (25, 28, 72, 96, 119). Zudem gewannen die Thrombozyten hinsichtlich der Pathogenese der Mikroangiopathie zunehmend an Interesse.

1.2 Thrombozytenaggregation in vivo und in vitro

Thrombozyten mit einer Lebensdauer von zehn Tagen zirkulieren im Blut als runde, scheibenförmige Zellen. Kontakt mit Subendothel oder Basalmembran, die durch Läsionen freiliegen, sowie mit Endothel infolge lokaler oder systemischer Reize (94) bewirkt eine Adhäsion der Thrombozyten. Sie führt ebenso wie Aggregantienzugabe in vitro (ADP, Kollagen, Serotonin, Archaidonsäure, Immunkomplexe) zu morphologischen Änderungen: die Plättchen entwickeln Pseudopodien, werden kugelförmig und bekommen eine rauhe, stachelige Oberfläche (146). Dieses Phänomen ist bekannt als "platelet shape change" und stellt die initiale Phase der Plättchenaggregation dar (118). Es führt zu Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den Zellgranula: aus den "dichten" Granula werden ADP, Serotonin und Calcium sezerniert, aus den zahlreicheren α -Granula Fibrinogen, Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin und ein "platelet mitogenic factor", der Migration und Proliferation vasculärer glatter Muskelzellen stimuliert (48, 125). Die Regulierung der Plättchenreaktivität erfolgt durch die membranständige Adenylatzyklase, die intrazelluläre Calciumkonzentration und das Gleichgewicht zwischen intrathrombozytärer Thromboxan A_2 -Bildung und Prostacyclinsynthese der Gefäßwände (102).

Aus Granula freigesetztes oder zugefügtes ADP besetzt

spezifische Rezeptoren der Plättchenmembran (13, 14, 133), führt zu Depolarisierung des Membranpotentials (147), Erniedrigung des cAMP-Spiegels (137) und unter ATP-Verbrauch zur Aggregation, wobei Fibrinogen, Calcium und Magnesium als Cofaktoren nötig sind (112).

Die Bindung von Kollagen an die Plättchenmembran erfolgt vor allem über das Glykoprotein Fibronectin und ist abhängig von der sterischen Anordnung der Kollagen-Moleküle: nur in geordneter quaternärer Struktur wird eine starke Adhäsion ausgelöst; Tropokollagen als Monomer bewirkt eine wesentlich schwächere Reaktion (57). Kollagen führt zur Degranulierung und ebenso wie ADP und Thrombin zur Aktivierung der Phospholipase A_2 (108).

Aktivierte Phospholipase A führt zu Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol (8). Sie ist ebenso wie im Aggregometer zugegebene Arachidonsäure Substrat der membranständigen Cyclooxygenase und wird über zyklische Endoperoxid-Zwischenstufen zum stark aggregationsfördernden, labilen Thromboxan A_2 abgebaut; zusätzlich bewirkt sie ebenfalls die Freisetzungsreaktion der α -Granula (86).

Daneben sind die Thrombozyten durch die membranständigen Faktoren XI und PF 3 und die Abgabe der Gerinnungsfaktoren VIII, V und I direkt am Gerinnungsvorgang beteiligt (93). Konsolidierung des Thrombozytenaggregats durch Fibrin und Retraktion durch Actomyosinelemente der Membran führen schließlich zum stabilen Thrombus.

1.3 Thrombozytenfunktion bei Diabetikern

Die normale Thrombozytenphysiologie scheint bei Diabetikern in vielerlei Hinsicht verändert zu sein.

Die Einführung des Aggregometers 1962 durch BORN (14) ermöglichte in vitro-Untersuchungen der Thrombozytenaggregation. Mehrere Autoren zeigten eine erhöhte Sensibilität der Plättchen von Diabetikern bei Aggregationsinduzierung mit ADP, Kollagen, Arachidonsäure oder Epinephrin und eine ausgeprägtere Spontanaggregation als bei Normalpersonen (17, 111). Diese Änderungen wurden mit diabetischen Spätkomplikationen assoziiert (6, 42, 53). Andere Verfasser fanden auch bei Diabetikern im Frühstadium schon eine gesteigerte Aggregation (29, 30, 46, 55, 126). Ebenso wurde über eine verstärkte Plättchenadhäsion in vitro berichtet (28, 63). Daneben liegen Untersuchungen vor, die im Gegensatz dazu keine Unterschiede der Plättchenreaktivität zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern nachweisen konnten (53, 115, 118, 119).

FERGUSON und JONES fanden bei Diabetikern eine verkürzte Lebensdauer der Thrombozyten (47, 73), ein Indiz für einen gesteigerten Plättchenverbrauch. Ein erhöhter Prozentsatz an Megathrombozyten im Blut von Diabetikern (30) weist in die gleiche Richtung; junge Plättchen sind reaktiver als ältere Plättchen.

Neuere Untersuchungen postulieren einen abnormalen Prostaglandin-Metabolismus bei Diabetes mellitus mit gesteigerter Aktivität der Cyclooxygenase und verstärkter intra-thrombozytärer Bildung von Thromboxan A_2 und Malondialdehyd (68, 84).

Die Messung von Plättchenfaktor 4 und β -Thromboglobulin ermöglicht zusätzlich die vivo-Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Freisetzung dieser Faktoren aus den α -Granula reflektiert direkt Aktivierung und Aggregationsneigung der Thrombozyten (129). Diabetiker, besonders Diabetiker mit Mikroangiopathie, scheinen erhöhte Serumspiegel sowohl an β -Thromboglobulin als auch an Plättchenfaktor 4 aufzuweisen (9, 44, 120).

Alle bisher genannten Untersuchungen konnten jedoch nur wenig zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit eine pathologische Thrombozytenfunktion Gefäßveränderungen bedingt oder ob nicht eher Gefäßschäden zur Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion führen.

Angeichts der unterschiedlichen Aussagen zur Thrombozytenfunktion bei Diabetikern sollten unsere Versuche einen Beitrag zur Klärung der Frage darstellen, inwieweit die Aggregation bei Diabetikern verändert ist und ob das Vorhandensein einer Mikroangiopathie Einfluß auf die Versuchsergebnisse zeigt. Zudem sollte im Rahmen einer Longitudinalstudie untersucht werden, ob diese eventuell vorhandenen Änderungen der Thrombozytenaggregation regelmäßig nachweisbar sind und wie sie auf eine Veränderung der diabetischen Stoffwechsellaage reagieren.

1.4 Chemie der MAILLARD-Reaktion

MAILLARD entdeckte 1912 die Reaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern (91), die später nach ihm benannt wurde. Er gab "ein Teil Glykoll, vier Teile Glucose und drei bis vier Teile Wasser" zusammen, erhitze das Gemisch im Wasserbad und beobachtete, wie die Flüssigkeit innerhalb von Minuten eine gelbe Farbe annahm, dann dunkelbraun wurde und schäumte. Schon damals wies er auf die Bedeutung dieser Entdeckung für die medizinischen Wissenschaften hin.

Doch über lange Zeit hinweg beschäftigten sich lediglich Lebensmittelchemiker mit diesem Phänomen wegen seiner großen Bedeutung hinsichtlich Verarbeitung, Vorratshaltung und Nährwert von Lebensmitteln. Die Zerstörung von Lysin und die Braunfärbung (52) während Erhitzung und langer Lagerung von Proteinen, besonders Getreide, in Gegenwart reduzierender Zucker stellte Ernährungswissenschaftler früher vor große Probleme (110). Dieser Vorgang, auch "browning reaction" genannt, ist aber nicht in jedem Falle unerwünscht: die Lebensmittelindustrie bedient sich seiner in großem Umfang zur Geschmacksverbesserung von Lebensmitteln (64, 85, 127).

Die MAILLARD-Reaktion läuft in drei Schritten ab: Ketoamin-Bildung, Entstehung diverser Sekundärprodukte und zuletzt deren Polymerisierung. Die erste Phase wird auch als "early Maillard", die zweite und dritte als "advanced Maillard" bezeichnet (49).

Die Reaktion beginnt mit der Kondensation der Amino-Gruppe einer Aminosäure mit einem Zucker in Aldehydform. Unter physiologischen Bedingungen existieren

Zucker ganz Überwiegend in der stabilen Ringform als α - oder β -Pyranosen und nur zu einem geringen Prozentsatz in der offenen Carbonylform (18). Dabei ist Glucose der am wenigsten reaktionsfreudige Zucker, da er nur zu 0,001-0,002 % in der offenen Carbonylform vorliegt (18, 100). Zwar begrenzt dieser Faktor die Reaktionshäufigkeit, doch ist die Kondensation von Glucose weitaus am häufigsten infolge ihrer überragenden biologischen Bedeutung.

Die Bindung an eine α - oder ϵ -Aminogruppe führt zur Bildung eines Glycosylamins (Aldimins) oder einer Schiff'schen Base (vgl. Abb. 1). Dieser Vorgang läuft schnell ab, ist reversibel und hängt von sterischen Faktoren und der Basizität der Carbonyl-Gruppe, nicht jedoch der Amino-Gruppe, ab (100). Im nachfolgenden irreversiblen Schritt isomerisiert die Schiff'sche Base zur Ketoamin-Form (sog. Amadori-Rearrangement), die äußerst stabil ist und erst durch längere Säurehydrolyse zu 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) reagiert (50). MCANS et al. vermuten, daß auf die Bildung des Ketoamins sofort Cyclisierung zum Hemiketal folgt, was möglicherweise die stabilste Form darstellt (100). An diesem Punkt kann die Reaktion entweder beendet sein, wie z.B. bei der Glykosylierung von Hämoglobin und Serumproteinen, oder weiter fortschreiten.

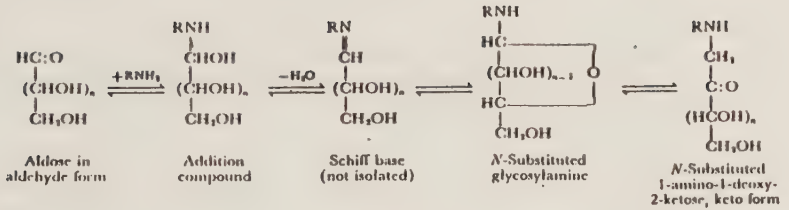


Abb. 1: Initiale Schritte der MAILLARD-Reaktion
nach HODGE (64).

Der letzte Schritt besteht in der Polymerisierung der Sekundärprodukte zu braunen, unlöslichen Pigmenten oder Melanoiden (117). Er wird beschleunigt durch steigenden pH und zunehmende Temperatur; Zufügen von Bisulfiten stoppt ihn sofort (127). Diese gelb-braunen Pigmente lassen sich z.B. in alternden oder kataraktischen Augenlinsen finden (104).

1.5 Diabetes und Glykosylierungsreaktion

HUISMAN und DOZY (GG) beobachteten 1962 an vier Diabetikern, daß ein bestimmter Typ schnellwandernder, glykosylierter Hämoglobine (HbA_1) in zwei- bis dreifach erhöhter Konzentration gemessen werden konnte. HOLMQUIST und SCHRÖDER (GS) zeigten daraufhin, daß HbA_{1c} , die größte Gruppe der "minor hemoglobins", dem HbA identisch ist bis auf einen noch zu definierenden Rest, der an die N-terminale Aminosäure Valin der β -Kette gebunden ist.

Neun Jahre später gelang es DUNN et al. (22), die Struktur dieses Restes aufzuklären, indem sie durch Säurehydrolyse Glucose von HbA_1 isolieren konnten. Sie wiesen nach, daß Glucose langsam und nichtenzymatisch während der gesamten Lebensspanne der Erythrozyten an Hämoglobin gebunden wird (21). Der Anteil des glykosylierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin beträgt beim Gesunden 4 % und ist bei Diabetikern je nach Ausprägung der Hyperglykämie um das zwei- bis fünffache erhöht (19, 20).

Nachdem schon vor sechzig (10) und vor zwanzig Jahren (7, 43, 67) festgestellt worden war, daß bei Diabetikern vermehrt Kohlenhydrate an Proteine gebunden werden, wiesen DAY et al. 1979 nach, daß auch Serumalbumin glykosyliert wird und zwar bevorzugt an der ϵ -Amino-Gruppe von Lysin (34, 35). Sie zeigten, daß beim Menschen normalerweise 6-15 % des Serumalbumins in glykosylierter Form vorliegt; dieser Anteil ist beim Diabetiker signifikant erhöht, ebenso wie auch die Werte des glykosylierten Gesamtproteins (95).

Das Ausmaß der verstärkten Glykosylierung wird ebenso wie beim HbA_1 durch vorangegangene Hyperglykämien bestimmt und spiegelt so die Einstellung des Diabetikers wider. Im Falle des Albumins mit einer Halbwertszeit von 19 Tagen (121) ermöglicht die Messung des glykosylierten Albumins einen Überblick über die Einstellung des Patienten in den vergangenen drei Wochen. DOLHOFFER et al. untersuchten das Verhalten von glykosyliertem Albumin und HbA_{1c} nach der Entdeckung ketoazidotischer und nichtazidotischer Komata und stellten fest, daß schon innerhalb einer Woche der Wert des Glykosyl-Albumins die verbesserte Stoffwechselsituation anzeigt, während HbA_{1c} über 17 Tage hinweg unverändert blieb (38).

Bald fand sich die Vermutung bestätigt, daß die Glykosylierungsreaktion nicht auf bestimmte Proteine beschränkt ist, sondern z.B. auch an Proteinen der Erythrozytenmembran (41), an Lipoproteinen (83, 152) und an Kollagen (88, 124) abläuft. LOTJENS berichtete von einer bei Diabetikern erhöhten Glykosylierung von Fibrinogen (87), CERIELLO (24) wies nach, daß die Verminderung der Antithrombin III-Aktivität bei Diabetikern durch Glykosylierung bedingt ist. Auch liegen Informationen über Glykosylierung von Basalmembranproteinen vor (26).

Diese zuletzt genannten Beobachtungen lassen die Vermutung zu, daß die Glykosylierungsreaktion auch für die Entstehung von Spätkomplikationen verantwortlich ist. WILLIAMS et al. (149) wiesen in vitro nach, daß erstens glykosyliertes Albumin - im Gegensatz zu unmodifiziertem - sehr leicht und schnell durch endotheliale Mikropinozytose in den Extravasalraum gelangen kann und zweitens erhöhte Serumspiegel an glykosyliertem Albumin das Endothel dahingehend verändern, daß nun auch unmodifiziertes Albumin hindurchtreten kann. Das könnte die schon vor längerer Zeit durch manche Untersucher gemachten Beobachtungen erklären, daß sich bei Diabetikern, auch ohne Mikroangiopathie, ein niedrigerer Albuminspiegel findet (43, 97, 107).

Unsere Untersuchungen befaßten sich mit der Frage, ob glykosyliertes Serumalbumin und Gesamtprotein geeignete Parameter zur Erfassung der Stoffwechsellage bei Diabetikern darstellen und welche Methode im klinischen Routinegebrauch praktikabler ist.

1.6 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit kann in drei Teile gegliedert werden:

Im ersten Teil sollte der Einfluß von Zeit, Thrombozytenkonzentration, Temperatur, Aggregantiendosis und Vorgehen bei Blutabnahme auf die Aggregation der Thrombozyten gesunder Probanden untersucht werden.

Im zweiten Teil wird die Entwicklung einer Methode zur Messung glykosylierter Albumine und Serumproteine beschrieben.

Im dritten Teil sollte mit diesen beiden Verfahren in einer longitudinalen Studie mit zehn Typ I-Diabetikern und alters- und gewichtsgleichen Kontrollpersonen geprüft werden, ob Thrombozytenaggregation und glykosylierte Proteine erhöht sind und wie sie sich bei Beobachtung über einen längeren Zeitraum verhalten.

2 THROMBOZYTENAGGREGATION

2.1 Reagentien

Alle benutzten Reagentien waren pro analysi.

2.1.1 Puffer

2.1.1.1 Tris-Puffer

Tris-Puffer 0,1M wurde auf folgende Weise hergestellt:

12,14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan werden mit 500 ml Aqua bidest. gemischt, darauf mit 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt, mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und der pH erneut überprüft.

2.1.1.2 Krebs-Henseleit-Puffer

Die Herstellung von 1000 ml 10fach-konzentriertem Puffer geschah folgendermaßen:

		mmol/l	g/l
Puffer A	NaCl	1200	70
	KCl	47	3,5
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	25	3,68
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	12	3,0

+ Aqua bidest. ad 1000 ml

Puffer D	KH_2PO_4	14,7	2,0
	NaHCO_3	250	21

+ Aqua bidest. ad 1000 ml

Puffer A und D wurden jeweils 1:5 verdünnt (Aqua bi-dest.) und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

2.1.1.3 Phosphatpuffer

Es wurden 1 molare Vorratslösungen von $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (MG 228, 23) und $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MG 137,99) hergestellt. Um einen 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 zu erhalten, wurden 10 ml der beiden Lösungen gemischt und mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

2.1.2 ADP

Adenosin-5-diphosphat von Serva Feinbiochemica Heidelberg wurde mit 0,9 %iger NaCl gelöst und eine Vorratslösung von 1 mg/ml hergestellt, die in Portionen zu 1 ml bei -20°C gelagert wurde. Die Verdünnung dieser Stocklösung mit kaltem Krebs-Henseleit-Puffer auf 1:10 sowie 1:40 führte zum gebrauchsfertigen Aggregans mit einer Konzentration von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ beziehungsweise $1,25 \times 10^{-4} \text{ M/l}$.

2.1.3 Kollagen

Kollagenreagenz Horm von Hormon-Chemie München enthält pro ml 1 mg native Kollagenfibrillen aus equinen Sehnen. Zur Thrombozytenaggregation wurde das Reagenz mit SKF Horm Puffer 1:40 entsprechend 25 µg/ml verdünnt.

2.1.4 Arachidonsäure

Arachidonsäure reinst, 5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure $C_{20}H_{32}O_2$, MG 304,5 wurde von Serva Feinbiochemica Heidelberg bezogen. Zur Herstellung der Vorratslösung von 10 mg/ml wurde zuerst 1/10 des Lösungsvolumens als n-Hexan zugegeben. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C. Für die Versuche wurden jeweils 200 µl entnommen und die Hexanphase durch N_2 -Übergasung entfernt. Das ölige Restvolumen wurde in 20 µl Äthanol und 100 µl 0,1M Tris-Puffer resuspendiert, was zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml führte.

2.2 Methodik

2.2.1 Blutabnahme

Die Entnahme von 15 ml Venenblut erfolgte mittels einer großlumigen Kanüle in eine 20 ml Kunststoffspritze, die 1,5 ml 3,8 %ige Natriumzitratlösung enthielt. Zusätzlich wurde etwa 1 ml Luft angesogen und danach der Spritzeninhalt vorsichtig gemischt.

2.2.2 Thrombozytenaufbereitung

Die Blutprobe wurde anschließend sofort auf 12 verschließbare Plastik-Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilt und in der Eppendorf-Tischzentrifuge 3.200 bei 8854 g und Raumtemperatur genau zwei Sekunden zentrifugiert. Die Zeit von zwei Sekunden erwies sich als die geeignetste zur größtmöglichen Ausbeute von plättchenreichem Plasma.

2.2.2.1 Thrombozytenreiches Plasma (Platelet-rich-plasma, PRP₁)

Nach dem Zentrifugieren wurden alle Oberstände sehr behutsam mit Eppendorf-Kolbenhubpipetten abgenommen und in ein Plastik-Reagenzglas gegeben. Die Menge an thrombozytenreichem Plasma aus 15 ml Blut betrug durchschnittlich 4,0 ml; zur Unterscheidung von Plasma mit einer definierten Zahl an Plättchen wird dieses thrombozytenreiche Plasma mit PRP₁ angegeben.

Die Thrombozytenkonzentration wurde mit der Sarstedt-Thromboplus-Methode bestimmt: 50 µl PRP₁ werden in das Teströhrchen gegeben und nach leichtem Mischen die Neubauer-Zählkammer mit einer Probe gefüllt. Nach fünf Minuten Sedimentierung in einer feuchten Petrischale erfolgte die Auszählung unter dem Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung. Die Vierfachwerte wurden gemittelt und mit dem Faktor 5000 multipliziert. Es ergab sich eine Thrombozytenkonzentration mit PRP₁ von durchschnittlich 220.000 - 420.000 pro µl.

2.2.2.2 Thrombozytenarmes Plasma (Platelet-poor-plasma, PPP)

PPP wurde erhalten, indem man das Restblut 2 Minuten zentrifugierte. Nach Abpipettieren und poolen des Oberstands konnte aus 15 ml Blut durchschnittlich 3,8 ml PPP gewonnen werden. Wiederholte Zählungen zeigten, daß das PPP vollkommen frei von Thrombozyten war.

2.2.2.3 Standardisiertes Plasma (PRP₂)

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Aggregationsmessungen ist eine stets gleichbleibende Thrombozytenzahl. Sie wurde deshalb bei den Vorversuchen innerhalb des Versuchs konstant gehalten, bei der Langzeitstudie auf 200.000/ μ l festgelegt (siehe 2.4.3) und als PRP₂ charakterisiert. Nach Zählung des Thrombozytengehaltes im PRP₁ wurde mit folgender Formel die Menge an PPP ermittelt, die zur vorhandenen Menge an PRP₁ gegeben werden muß, um diese Konzentration zu erhalten:

$$\frac{\text{PRP}_1 \text{ (ml)} \times \text{Thrombozahl}}{200.000} = x \text{ ml}$$

x stellt das Endvolumen von PRP₂ dar;
x ml - PRP₁ (ml): ergibt die fehlenden ml PPP,
die an PRP₁ zugegeben werden müssen, um PRP₂
zu erhalten.

2.2.3 Aggregometer-Schreiber-Einheit

Zur Thrombozytenaggregation wurde ein Labor-Aggregometer Typ 2 K Nr. 137 der Firma Fresenius, Bad Homburg, benutzt. Das Gerät arbeitet nach dem Photometerprinzip, wobei das Ausmaß der Aggregation durch eine Zunahme der Lichttransmission gemessen wird. Das Gerät ist mit zwei unabhängig voneinander arbeitenden Lichtkanälen ausgestattet, in die wahlweise 200 oder 400 μ l-Flexiglas kuvetten eingesetzt werden können, so daß zwei Proben gleichzeitig gemessen werden können. Die Betriebstemperatur wird konstant auf 37°C gehalten, die Rührergeschwindigkeit kann stufenlos von 0 rpm bis 2000 rpm reguliert werden. Die Änderung der Lichttransmission wird durch einen Zweikanalflachsreiber (Typ DD 9) der Firma Kipp und Zonen, Delft, mit variabler Spreizung und stufenweise regelbarer Papiervorschubgeschwindigkeit aufgezeichnet. Für die vorliegenden Versuche wurde eine Rührergeschwindigkeit von 1100 rpm, eine Spreizung von 0,1 V und ein Papiervorschub von 10 mm/min gewählt.

Bei der Auswertung wurde vom maximalen Ausschlag des Schreibers der aufgezeichnete Basis-Leerwert abgezogen und die Differenz als Wert der Aggregation in % angegeben.

2.2.4 Durchführung der Aggregation

Die Aggregationsmessungen erfolgten nach dem von Dorn angegebenen Verfahren (14). Eine halbe Stunde vor Meßbeginn wurde das Gerät zum Erreichen der Betriebstemperatur eingeschaltet. Je 400 μ l des bei Raumtemperatur aufbewahrten standardisierten Plasmas PRP_2 wurden in 7 Plexiglasküvetten pipettiert. Bei der Langzeitstudie erfolgte die erste Messung genau 35 Minuten nach Blutabnahme, jede weitere Messung 7 Minuten später. Dieser genaue Zeitplan war zur interindividuellen Vergleichbarkeit der Meßwerte unbedingt erforderlich, da das Ausmaß der Aggregation stark vom Zeitintervall zwischen Blutabnahme und Meßbeginn abhängt (siehe 2.4.1). Nach Einsetzen der Küvette in den Lichtkanal wurde der Magnetrührer behutsam mit der Pinzette dazugegeben, da Blasenbildung vermieden werden sollte. Durch Drücken der Starttaste wurde der Lichttransmissionsleerwert automatisch kalibriert und eine einminütige gerade Basislinie aufgezeichnet. Nach einer Minute wurde das Aggregans zupipettiert.

2.2.4.1 ADP-induzierte Aggregation bei Normalpersonen

Nach Zugabe von ADP zeigte sich sofort eine starke Zunahme der Lichttransmission (Abb. 2). Bei der Aggregation können zwei Phasen unterschieden werden: eine reversible "first phase" und eine irreversible "second phase". Bei niedriger Konzentration des zugegebenen Aggregans zeigt sich eine submaximale Aggregation, die "first-phase-aggregation", der sogleich die Desaggregation folgt (1). Dies beruht darauf, daß die Plättchen zwar einem Gestaltwechsel unterliegen und kleine Aggregate bilden, die ADP-Dosis jedoch zur Freisetzung des Inhalts der Zellgranula zu gering ist.

Bei der irreversiblen Aggregation können first- und second-phase entweder noch deutlich voneinander unterschieden werden (2), oder völlig ineinander übergegangen sein (3). Der "second-phase" entspricht die Bildung dichter, unauflöslicher Thrombozytenaggregate infolge Freisetzung von endogenem ADP, CA^{++} , 5-Hydroxytryptamin, Plättchen- und Gerinnungsfaktoren, die umso schneller erfolgt, je höher die zugeführte ADP-Konzentration war.

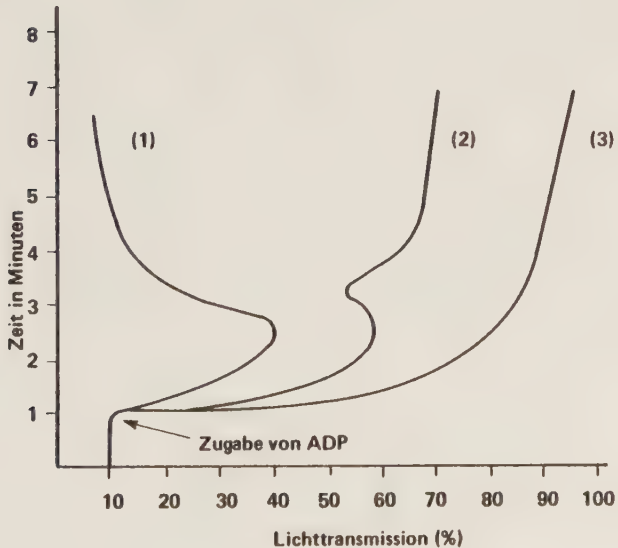


Abb. 2: Beispiele von Kurvenverläufen nach Aggregationsinduzierung mit ADP

2.2.4.2 Kollagen-induzierte Aggregation bei Normalpersonen

Kollagen führte zu unterschiedlichen Aggregationskurven: nach Zugabe des Aggregans fand sich eine Verzögerungszeit von durchschnittlich 60 Sekunden, die auf einer Adhäsion der Blutplättchen an den Kollagenfibrillen beruht (57, 100). Der nun folgende Gestaltwechsel der Thrombozyten (shape change) vollzog sich langsamer als bei Induzierung mit ADP und führte zu einer kurzfristigen Abnahme der Lichttransmission. Danach kam es entweder zu vollständiger (vgl. Abb. 3, Kurve (2)) oder zu reversibler submaximaler (vgl. Abb. 3, Kurve (1)) Aggregation.

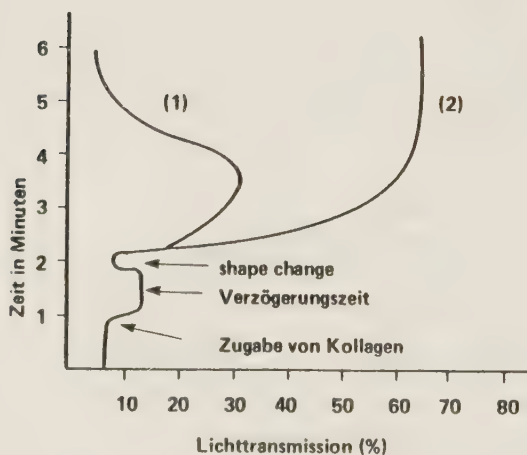


Abb. 3: Kurvenbeispiele nach Aggregationsinduzierung mit Kollagen

2.2.4.3 Arachidonsäure-induzierte Aggregation bei Normalpersonen

Die Zugabe von Arachidonsäure führte nur bei einem Teil der Probanden zur Aggregation: es fiel deutlich ein "Alles-oder-Nichts"-Effekt auf, wobei sich bei eingetretener Aggregation kein Unterschied im Ausmaß der Aggregation zeigte, unabhängig davon, ob 300 oder 500 $\mu\text{g/ml}$ PRP zugegeben wurden. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion äußerte sich im Unterschied der Frequenz, in der eine Aggregation ausgelöst werden konnte.

Nach Zupipettieren des Aggregats zeigte sich sofort ein Ausschlag entgegen der Hauptrichtung, der nach wenigen Sekunden in der Gegenrichtung verlief (vgl. Abb. 4). Bei der Kurvenauswertung wurde eine nicht eingetretene Aggregation mit 0 % gewertet und bei der Berechnung von Mittelwert und SEM miteinbezogen. Zudem wurde die Frequenz ermittelt, mit der eine Aggregation bei verschiedenen Dosen von Arachidonsäure und abhängig vom untersuchten Kollektiv eintrat (siehe 4.2.3).

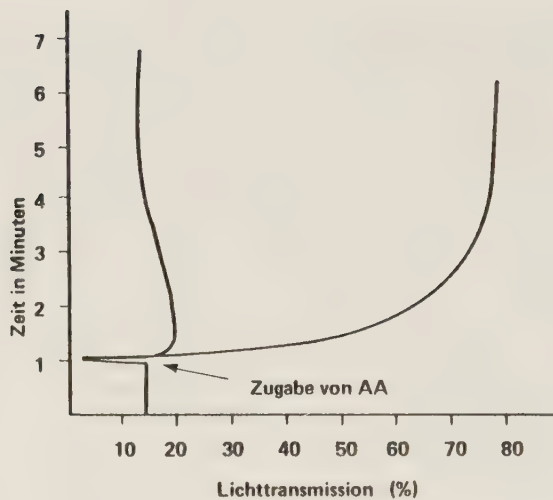


Abb. 4 : Kurvenbeispiele nach Aggregationsinduzierung mit Arachidonsäure (AA)

2.3 Statistische Auswertung

Die Resultate wurden als $MW \pm SEM$ angegeben.

Die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Standardabweichung des Mittelwertes erfolgte mit einem Diehl alphanetronic-Tischrechner.

Die Standardabweichung am Einzelmeßwert (SD) wurde hierbei nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

Die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) ist:

$$SEM = \frac{SD}{n}$$

Für die statistischen Berechnungen am Siemens Computer Data 404 wurde der Student's t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Außerdem wurden Korrelationskoeffizient und lineare Regression berechnet.

2.4 Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Faktoren

Vor Beginn der Diabetikerstudie sollten einzelne Parameter untersucht werden, die das Aggregationsverhalten der Thrombozyten *in vitro* beeinflussen, da hierzu in der Literatur widersprüchliche Aussagen vorliegen oder zu gewissen Punkten kaum Untersuchungen zu finden sind.

Das Venenblut für alle Versuche stammte von fünf gesunden, normalgewichtigen Probanden beiderlei Geschlechts, die keine Medikamente einnahmen; kurz vorher hatten sie eine leichte Mahlzeit zu sich genommen. Als Aggregantien kamen ADP und Kollagen in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz.

2.4.1 Zeitabhängigkeit

Die Aggregationsmessungen begannen zwischen 90 und 150 Minuten nach Blutabnahme und wurden über fünf bis sechs Stunden fortgeführt. Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur, die durchschnittliche Thrombozytenzahl betrug $250.000/\mu\text{l} \pm 6.000$ (MW $\pm$ SEM). Aggregiert wurde mit ADP in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{M/l}$ und 5 $\mu\text{M/l}$ sowie mit einer Kollagenkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

In dem von uns untersuchten Zeitintervall nach Blutentnahme zeigte sich eine deutliche Abnahme der Thrombozytenaggregation bei beiden Aggregantien (vgl. Abb. 5).

Bei der ADP-induzierten Aggregation ergab sich bei der niedrigen Konzentration von $2,5 \mu\text{M}/1$ ein stündlicher Abfall der Lichttransmission von $8,2 \%$, bei Zugabe von $5 \mu\text{M}/1$ ADP eine Abnahme von $4,8 \%$ (vgl. Tab. 1). Derselbe Effekt zeigte sich bei der Induzierung mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen: Die Abnahme der Lichttransmission in Prozent betrug pro Stunde $5,8 \%$.

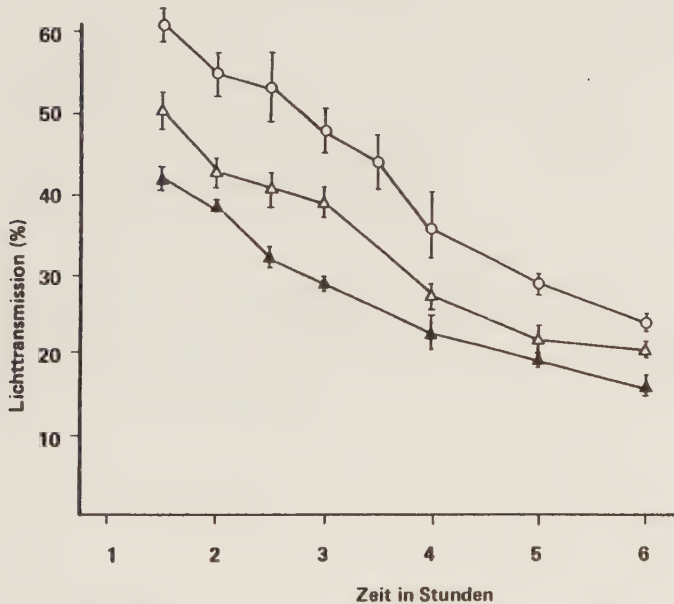


Abb. 5: Abnahme der Lichttransmission in der Zeit bei Aggregationsinduzierung mit ADP $2,5 \mu\text{M}$ (▲-▲-▲), ADP $5 \mu\text{M}$ (○-○-○) und Kollagen $2,5 \mu\text{g}$ (▼-▼-▼).

Aggregans		Lichttransmission	
ADP	2,5 μ M/l	8,2% $\pm$ 1,7	(6)
ADP	5 μ M/l	4,8% $\pm$ 1,2	(5)
Kollagen 2,5 μ g/ml		5,8% $\pm$ 0,7	(9)

Tabelle 1: stündliche Abnahme der Lichttransmission
in Prozent (MW $\pm$ SEM).

Anzahl der Bestimmungen in Klammern.

Bei der Langzeitstudie, die in Abschnitt 4 beschrieben wird, wurde deshalb mit den Aggregationsmessungen möglichst bald nach Blutentnahme begonnen und folgender Zeitplan bei jeder Untersuchung befolgt (vgl. Tab. 2):

Zeit nach Blutabnahme	Aggregans
35'	ADP 2,5 $\mu\text{M/l}$
42'	ADP 1,25 $\mu\text{M/l}$
49'	Koll 0,625 $\mu\text{g/ml}$
56'	Koll 1,25 $\mu\text{g/ml}$
1h03'	AA 300 $\mu\text{g/ml}$
1h10'	AA 500 $\mu\text{g/ml}$
1h17'	spontan

Tabelle 2: Zeitplan der Aggregationsmessungen bei der
Langzeitstudie

2.4.2 Temperaturabhängigkeit

Die Plexiglasküvetten mit je 400 μl PRP_2 desselben Blutspenders ($n = 3$) wurden entweder in Eis gelagert, bei Raumtemperatur (22 °C) aufbewahrt oder im Aggregometer bei 37 °C. Die in Eis gelagerten Proben wurden für die Messungen vier Minuten vorher im Aggregometer aufgewärmt. Die Untersuchungen begannen 90 Minuten nach Blutabnahme und wurden bis zu 6 Stunden danach aufgezeichnet. Abb. 6a und Abb. 6b zeigen die Abnahme der Lichttransmission in der Zeit von bei verschiedenen Temperaturen gelagertem PRP_2 .

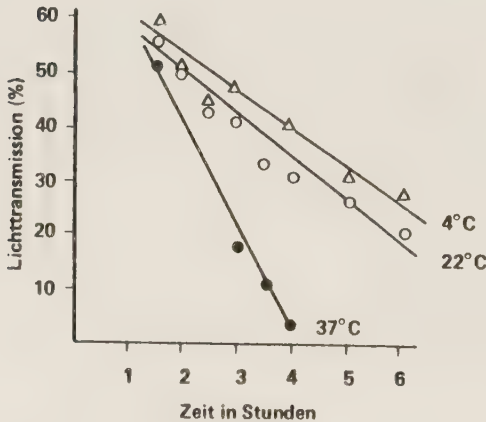


Abb. 6a:

Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aufbewahrungstemperatur. Induzierung mit ADP 5 $\mu\text{M/L}$.

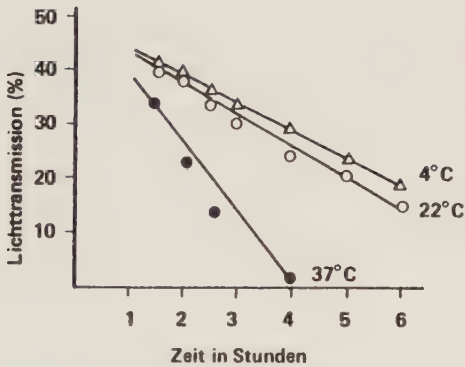


Abb. 6b:
Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aufbewahrungstemperatur. Induzierung mit Kollagen 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

In Tabelle 3 wurde die Abnahme der Lichttransmission pro Stunde für jedes Aggregans berechnet. Diejenigen Proben, die bei 37 °C aufbewahrt worden, zeigten eine wesentlich ausgeprägtere Abnahme der Aggregationsfähigkeit als Proben nach Aufbewahrung bei Raumtemperatur (vgl. Abb. 6a, 6b). Später als vier Stunden nach Blutentnahme war bei ersteren keine Aggregation mehr auszulösen.

	4 °C	22 °C	37 °C
ADP 5 µM/l	6,2%	7,3%	19,2%
ADP 2,5 µM/l	5,5%	6,3%	-
Koll 2,5 µg/ml	5,2%	5,3%	13,6%
Koll 1,25 µg/ml	4,8%	5,5%	-

Tabelle 3: Änderung der Lichttransmission in % pro Stunde bei Aufbewahrung des PRP₁ bei 4 °C, 22 °C (Raumtemperatur) und 37 °C.

Da die Aufbewahrung in Eis nur zu einer geringfügig schwächeren Aggregationsabnahme pro Stunde führte als Aufbewahrung bei Raumtemperatur, wurden alle weiteren Messungen mit PRP₁ vorgenommen, das bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde.

2.4.3 Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl

Für diese Versuche wurde PRP_1 mit PPP zu Konzentrationen von 100.000, 200.000 und 300.000 Thrombozyten pro μl ausverdünnt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur, die Messungen begannen 90 Minuten nach Blutentnahme. Tabelle 4 zeigt die prozentuale Zunahme der Lichttransmission bei verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen.

		Thrombozytenzahl/ μl PRP_1		
		300.000	200.000	100.000
ADP	5 $\mu\text{M/l}$	75 $\pm$ 3,0	40 $\pm$ 2,1	15 $\pm$ 1,8
Kollagen	2,5 $\mu\text{M/l}$	73 $\pm$ 3,7	48 $\pm$ 2,1	15 $\pm$ 2,9

Tabelle 4: Veränderung der Lichttransmission in % bei durch ADP oder Kollagen induzierter Aggregation von PRP_1 mit verschiedenen Thrombozytenzahlen pro μl (n = 6, MW $\pm$ SEM)

Es stellte sich eine linear-proportionale Abhängigkeit der Aggreabilität von der Thrombozytenzahl dar, die auf einem rein physikalischen Phänomen beruhen dürfte: die Lichtdurchlässigkeit ist umso geringer, je höher der Thrombozytengehalt im PRP ist, und bei Aggregation ist dadurch die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit auch größer.

Bei der Langzeitstudie wurden die Aggregationsmessungen aus praktischen Gründen mit einer Thrombozytenkonzentration von 200.000/ μ l im PRP₂ vorgenommen, da zur Erlangung einer höheren Konzentration relativ mehr Venenblut benötigt würde.

2.4.4 Einfluß der Blutabnahmetechnik

Die Frage wurde untersucht, ob bei einer von uns durchgeführten Blutentnahme bei völlig ungestauter Vene andere Meßergebnisse bei der Aggregation gewonnen werden als nach Anlage einer Staubinde. Dazu wurde ein Quick-Cath-Desteck mit weittlumiger Teflonnadel verwendet und je 20 ml bei ungestauter Vene und nach Anlegen der Stauung abgenommen. Die Messungen begannen 70 Minuten nach Blutentnahme und wurden bei Raumtemperatur mit einer Thrombozytenzahl von 370.000 ± 20.000 durchgeführt.

Thrombozytenreiches Plasma, das nach ungestauter Venenpunktion gewonnen wurde, zeigte eine deutlich stärkere Aggregation: nach Zugabe von 5 μ M/l ADP lagen die Werte um $48,9 \pm 12,0$ % (MW $\pm$ SEM) höher, verglichen mit PRP nach Abnahme unter Stauung. Bei Induzierung der Aggregation mit 2,5 μ g/ml Kollagen fand sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Aggregation bei ungestauter Abnahme: hier lagen die Werte um $48,0 \pm 12,8$ % (MW $\pm$ SEM) höher.

Bei der Langzeitstudie erfolgte die Blutentnahme aus technischen Gründen nach Anlegen einer Stauung.

2.4.5 Zentrifugenvergleich

Um das Zeitintervall zwischen Blutabnahme und Aggregationsbeginn möglichst kurz halten zu können, wurde die Möglichkeit getestet, mit der Eppendorf-Tischzentrifuge 3.200 bei 8.854 g (12.000 Umdrehungen/min.) quantitativ und qualitativ gleichwertiges PRP₄ zu erhalten wie nach Zentrifugierung in einer Hettich Roto Silenta-Raumzentrifuge bei 250 g (1.000 Umdrehungen/min.).

Thrombozytenzählungen nach jeweils 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 Sekunden ergaben, daß sich nach 2 Sekunden die größte Anzahl von Thrombozyten im PRP₄ befindet. Thrombozytenzählungen in Blutproben, von denen die eine Hälfte in der Raumzentrifuge 10 Minuten bei 250 g (1.000 Umdrehungen/min.) zentrifugiert wurde und die andere Hälfte 2 Sekunden in der Tischzentrifuge, ergaben vergleichbare Mittelwerte mit einer maximalen Abweichung von $\pm 6\%$.

Zur Feststellung eines eventuell differierenden Aggregationsverhaltens wurden vergleichende Aggregationsmessungen mit ADP und Kollagen durchgeführt. Bei gleicher Thrombozytenkonzentration und gleichem Zeitabstand nach Blutentnahme ergaben sich für die mit 5 $\mu\text{M/l}$ ADP induzierte Aggregation $15,6 \pm 7,7\%$ (MW $\pm$ SEM, n = 5) höhere Werte für PRP₄, das 2 Sekunden in der Tischzentrifuge zentrifugiert wurde im Vergleich zur Raumzentrifuge. Bei Aggregationsauslösung mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen lagen die Werte nach Kurzzeit-Zentrifugierung um $14,9 \pm 5,3\%$ (MW $\pm$ SEM, n = 5) höher verglichen mit PRP₄ nach zehnminütiger Zentrifugierung in der Raumzentrifuge.

Da eine Zentrifugierung bei hoher Umdrehung über nur 2 Sekunden die Zubereitungszeit verkürzt und die Plättchenreaktivität nicht beeinträchtigt, wurde bei der Langzeitstudie auf diese Weise vorgegangen.

2.4.6 Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aggregantienkonzentration

Um eine eventuell gesteigerte Thrombozytenaggregation bei Diabetikern feststellen zu können, sind für die Untersuchungen Konzentrationen der Aggregantien erforderlich, die zu einer submaximalen Aggregation der Thrombozyten führen.

In dieser Versuchsreihe sollte anhand ansteigender Konzentrationen von ADP (0,625 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M pro Liter) und Kollagen (0,625 μ g, 1,25 μ g, 2,5 μ g und 5 μ g pro ml) diejenigen Dosen ermittelt werden, die bei Normalpersonen submaximale Aggregationskurven bewirken. Die Messungen (n = 8) begannen 30 Minuten nach Blutentnahme und wurden nur jeweils 4 Minuten lang durchgeführt, um den Zeitfaktor möglichst gering zu halten; die Thrombozytenkonzentration betrug 200.000/ μ l.

Die Induzierung der Aggregation mit 5 μ M/l ADP führte bei allen Probanden zur Maximalaggregation (51 $\pm$ 2,8 %, MW $\pm$ SEM), bei Verdoppelung der Dosis ließen sich die Werte nicht weiter steigern (46 $\pm$ 3,5 %, MW $\pm$ SEM) (Abb. 7). Die Aggregationskurven zeigten in allen Fällen eine irreversible "second-phase" Aggregation.

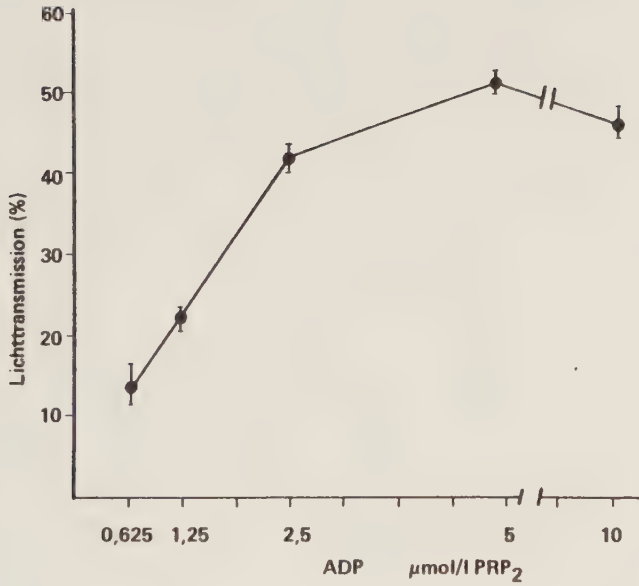


Abb. 7: Einfluß steigender ADP-Konzentrationen auf die Zunahme der Lichttransmission

Bei Verwendung von $2,5 \mu\text{M/l}$ und $1,25 \mu\text{M/l}$ ADP⁺ lagen die Mittelwerte deutlich niedriger: $41 \pm 3,3 \%$ bzw. $21 \pm 1,6 \%$ (MW $\pm$ SEM); diese Konzentrationen wurden demgemäß in der Diabetikerstudie verwendet. Hier war die first-phase-Kurve entweder von Desaggregation gefolgt, oder es schloß sich eine noch deutlich unterscheidbare second-phase-Kurve an. Zugabe von $0,625 \mu\text{M/l}$ ADP⁺ führte zu einer schwachen first-phase Aggregation ($13 \pm 0,0 \%$, MW $\pm$ SEM), die in allen Fällen von Desaggregation gefolgt war (vgl. Abb. 8).

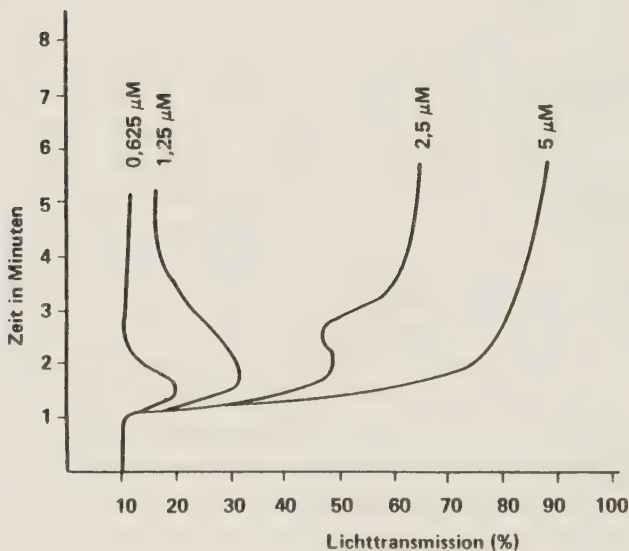


Abb. 8: Beispiel der Aggregationskurvenverläufe nach Zugabe verschiedener ADP-Konzentrationen

Bei der Aggregation mit Kollagen zeigte sich ebenfalls eine Dosis-Wirkungsbeziehung (vgl. Abb. 9). Induzierung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen führte in allen Fällen zur Maximalaggregation ($52 \pm 7,3 \%$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$); oft wurde sie auch bei Verwendung von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet ($44 \pm 5,7 \%$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$). Bei Kollagenkonzentrationen von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ und 0,625 $\mu\text{g/ml}$ ergaben sich Mittelwerte von $42 \pm 4,7 \%$ bzw. $30 \pm 7,0 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$).

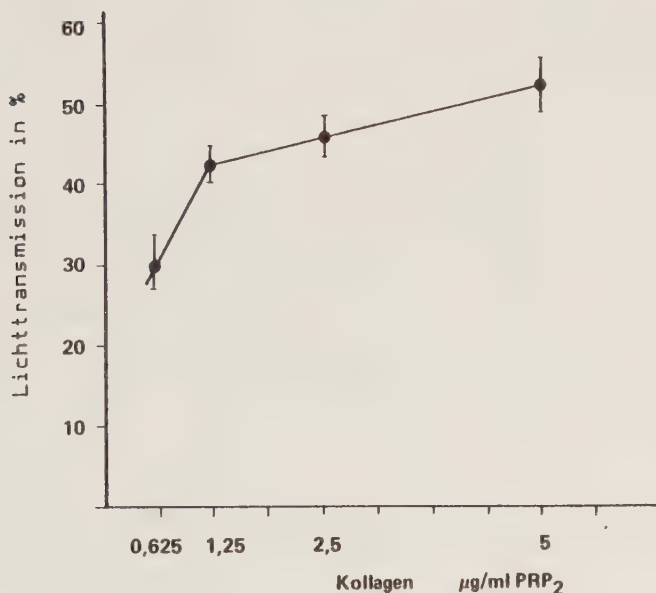


Abb. 9: Einfluß steigender Kollagen-Konzentrationen auf die Zunahme der Lichttransmission

Die niedrigste Kollagenkonzentration von 0,625 $\mu\text{g/ml}$ reichte nicht in allen Fällen zur Induzierung einer vollständigen Aggregation aus; oft folgte nach kurzer Zeit die Desaggregation (vgl. Abb. 10).

Insgesamt zeigte sich bei Induzierung mit Kollagen eine stärkere interindividuelle Schwankung der Dosisabhängigkeit als bei ADP, was sich auch aus den höheren SEM-Werten ersehen läßt (vgl. Abb. 9).

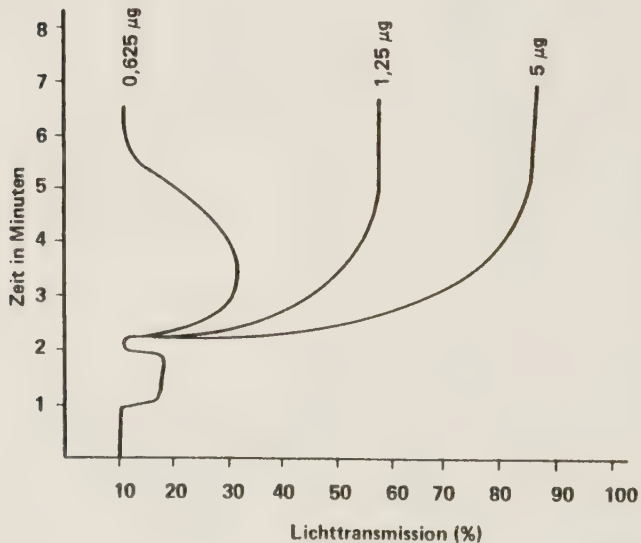


Abb. 10: Beispiel der Aggregationskurvenverläufe nach Zugabe verschiedener Kollagen-Konzentrationen

2.4.7 Aggregation in nüchternem und nicht-nüchternem Zustand

Zur Klärung der Frage, ob sich das Ausmaß der Thrombozytenaggregation wesentlich ändert, wenn die Blutentnahme nicht am nüchternen Probanden, wie es bei diabetischen Patienten erwünscht wäre, sondern postprandial erfolgt, wurde bei drei gesunden Normalpersonen an zwei verschiedenen Tagen die Aggregation gemessen. Die Blutentnahme erfolgte zur selben Uhrzeit; zur ersten Untersuchung erschienen die Probanden nüchtern, vor der zweiten Untersuchung hatten sie eine Stunde zuvor eine kleine Mahlzeit eingenommen.

Die Thrombozytenzahl im PRP betrug 200.000 pro μl , die Aufbewahrung des Plasmas erfolgte bei Raumtemperatur. Es zeigte sich eine stärkere Aggregation, wenn die Blutentnahmen postprandial erfolgt waren; die Zunahme betrug bei Induzierung mit $2,5 \mu\text{M/l}$ ADP $11 \pm 5,8 \%$, bei Zugabe von $500 \mu\text{g/ml}$ Arachidonsäure $7 \pm 2,4 \%$ (MW $\pm$ SEM). Bei Kollagen ergab sich kaum eine Veränderung: es ließ sich eine Abnahme von $0,3 \pm 0,2 \%$ (MW $\pm$ SEM) verzeichnen.

Die Aggregationsmessungen der Langzeitstudie wurden aus praktischen Gründen ein bis vier Stunden postprandial durchgeführt.

2.5 Qualitätskontrolle

Der mittlere Variationskoeffizient von Proben derselben Versuchsperson ($n = 3$), die an jeweils sechs verschiedenen Tagen untersucht wurden, betrug bei Aggregationsinduzierung mit ADP $2,5 \mu\text{M} \pm 17,8 \%$ und für ADP $1,25 \mu\text{M} \pm 31,2 \%$. Bei Zugabe von Kollagen ergab sich bei einer Konzentration von $1,25 \mu\text{g/ml}$ ein Variationskoeffizient von $\pm 29,8 \%$, bei $0,625 \mu\text{g/ml}$ Kollagen $\pm 82,3 \%$.

3 GLYKOSYLIERTE PROTEINE

3.1 Probensammlung

10 ml heparinisiertes Blut wurde unmittelbar nach Venenpunktion 10 Minuten bei 2000 g (3000 Umdrehungen/min.) zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde mittels Eppendorf-Pipette vorsichtig abgesaugt und in Dialyseschläuche eingegeben. Die anschließende Dialyse in 1000 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 hatte zum Zweck, die freie Glucose aus dem Plasma vollständig zu eliminieren.

Die Dialyseschläuche wurden in Meßzylinder eingehängt und 12 Stunden in einem Kühlraum bei +5 °C auf Magnetrührapparaten belassen. Das dialysierte Plasma wurde bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.2 Bestimmung des glykosylierten Albumins (GSA)

3.2.1 Prinzip der Methode

Nach affinitätschromatographischer Trennung des Albumins von den Serumproteinen und Konzentrierung auf 10 mg Albumin/ml erfolgt die Säurehydrolyse über 24 Stunden bei 92 °C. Dadurch reagiert nichtenzymatisch gebundene Glucose zu 5-Hydroxy-2-methylfurfuraldehyd (IMF), das nach Zugabe von Thiobarbitursäure (TBA) einen gelblichen Farbkomplex bildet, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 443 nm erfaßt werden kann.

3.2.2 Affinitätschromatographische Trennung des Albumins mit "Affi Gel Blue"

Als Chromatographiesäulen wurden 10 ml Kunststoffspritzen (ohne Stempel) verwendet, die in einen selbstgebauten Ständer eingehängt wurden. In die Säulen wurden 7 ml "Affi Gel Blue" (BIO-RAD Laboratories, Richmond USA) eingegeben und mit 14 ml 0,02 M Phosphatpuffer 6,8 vorgespült. Um eine konstante und gleichmäßige Zufuhr der Elutionsflüssigkeiten in die Säulen zu gewährleisten, erfolgte der Transport mittels einer Ismatec-Schlauchpumpe. Nun wurde 1 ml des dialysierten Plasmas mitten auf die Säule pipettiert und anschließend mit 14 ml Phosphatpuffer sämtliche Serumproteine außer Albumin eluiert. Mit 14 ml Phosphatpuffer, der zusätzlich 1,6 M NaCl enthält, erfolgte die Elution von Albumin, das mit einem Tropfenfraktiometer in 14 Fraktionen à 1 ml aufgefangen wurde.

Danach wurden die Chromatographiesäulen mit 12 ml 8 M Harnstoff in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 regeneriert und zum Aufbewahren mit 0,02 %iger Natriumazid-Lösung gespült, um möglichem Bakterien- oder Pilzwachstum vorzubeugen.

Fraktion 4 - 9 wurden gepoolt (= 6 ml) und mittels Biuretmethode die Albuminkonzentration gemessen.

3.2.3 Konzentrierung des Chromatographieeluats

Von den 6 ml des ursprünglichen Chromatographieeluats wurden 600 μ l benutzt, um die Albuminkonzentration im Eluat mittels Biuretmethode zu bestimmen. Zusätzlich wurde mit 500 μ l des Eluats eine Elektrophorese zur Reinheitskontrolle des Albumins durchgeführt.

Anschließend wurde das Eluat eingeeengt. Diese Konzentrierung der Proben erfolgte mit dem Millipore Pellicon Karussell (XX 4200050) mit 4 Molekularfiltrationszellen unter Verwendung von Millipore Pellicon Membranen PSED 02510, deren Porengröße so bemessen war, daß die relativ großen Albuminmoleküle (MG 67.000) die Membran nicht passieren konnten.

Nach Einengung wurde nochmals eine Albuminkonzentrationsmessung mittels Biuret vorgenommen, um die exakte Albuminkonzentration zu ermitteln.

3.2.4 Säurehydrolyse und Messung von 5-HMF

Nach der modifizierten Methode von DOLHOFFER und WIELAND (39) wurden 400 μ l Eluat mit einem Albumingehalt von 10mg/ml mit 60 μ l Eisessig gemischt und 24 Stunden in einem Eppendorf Wärmeblock 3401 bei einer konstanten Temperatur von 92 °C verschlossen erhitzt. Diese Reaktion führt zur Spaltung der nonenzymatisch gebildeten 1-amino-1-deoxy-2-ketose (Ketoamin), wobei pro Mol gebildeten 5-Hydroxymethyl-2-furfurals 3 Mol H_2O freiwerden.

Nach Abkühlung im Eisbad für 5 Minuten wurden zur Proteinfällung 100 µl 3 M Trichloressigsäure zugegeben, sehr gründlich gemischt und 10 Minuten lang in einer Eppendorf-Zentrifuge Modell 3200 bei 8854 g (12.000 Umdrehungen/min.) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 400 µl in ein neues Eppendorfgefäß abpipetiert, 200 µl 0,05 M Thiobarbitursäure dazugegeben und bei 40 °C 30 Minuten lang in einem Eppendorf Hitzeblock inkubiert. Danach wurde der Gehalt der einzelnen Proben an 5-Hydroxymethylfurfural bei einer Extinktion von 443 nm im Photometer gemessen und nach folgender Formel berechnet:

$$350 \times \Delta E = \frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{mmol Albumin}}$$

3.3 Abhängigkeit der Bestimmung von glykosyliertem Serumalbumin von verschiedenen Faktoren

3.3.1 Kontrolle der Albuminwiederfindung nach Affinitätschromatographie mittels ^{51}Cr -Albumin

Mit radioaktiv markiertem Albumin (^{51}Cr -Albumin) wurde nachgewiesen, daß $15 \pm 3,7 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) der aufgetragenen Gesamtalbuminmenge auch nach gründlichster Regeneration mit 8 M Harnstoff in der mit Affi-Gel bepackten Chromatographiesäule verbleiben.

Aus diesem Grund wurde frisches Affi-Gel vor der ersten Verwendung zu Meßreihen mit 20 %igem Rinderalbumin in H_2O durchgespült und mit 20 ml 8 M Harnstoff regeneriert. Danach war die Wiederfindung von aufgetragenem dialysiertem ^{51}Cr Albumin $91,5 \pm 3,9 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$), so daß angenommen werden kann, daß die freien Bindungen der Cibaron^R-Agarose für Albumin dadurch abgesättigt sind und nachfolgend aufgetragenes Albumin wieder vollständig eluiert werden kann.

3.3.2 Einfluß des pH der Elutionspuffer auf die Albuminwiederfindung nach Affinitätschromatographie

Es wurde geprüft, ob die Albuminausbeute durch pH-Änderung des 0,02 M Phosphatpuffers + 1,6 M NaCl optimiert werden kann.

Nachdem die mit Affi-Gel gefüllten Chromatographiesäulen vorgespült, das Serum aufgetragen und die Serumproteine außer Albumin mit Phosphatpuffer vollständig eluiert waren, wurden je 3 Versuchsreihen

mit 1,6 M NaCl Phosphatpuffer von pH 6,8 und pH 8,0 durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, daß die Albuminausbeute bei einem Elutionspuffer von pH 6,8, bezogen auf den Ausgangswert des dialysierten Serumalbumins von 100 %, bei 82 ± 3 % ($MW \pm SEM$) liegt, während sich bei einem Elutionspuffer von pH 8,0 eine Konzentration des Albumineluats von 73 ± 3 % ($MW \pm SEM$) fand. Da also bei Elution mit 0,02 M Phosphatpuffer in 1,6 M NaCl pH 6,8 die Wiederfindung von Albumin deutlich besser ist, wurden alle folgenden Versuche mit diesem Puffer durchgeführt.

3.3.3 Einfluß der NaCl-Konzentration des Elutionspuffers auf die Albuminwiederfindung

Die Abhängigkeit des Albumingehaltes im Eluat ist möglicherweise von der NaCl-Konzentration des 0,02 M Phosphatpuffers pH 6,8 abhängig. Dazu wurden sechs Versuchsreihen mit 1,4 M, 1,6 M und 1,8 M NaCl in 0,02 M Phosphatpuffer durchgeführt.

Die Wiederfindung nach Elution mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 plus 1,4 M NaCl, 1,6 M NaCl oder 1,8 M NaCl betrug $79 \pm 2,7$ % ($MW \pm SEM$), $85 \pm 4,6$ % ($MW \pm SEM$) und $75 \pm 2,0$ % ($MW \pm SEM$) respektive, bezogen auf den Ausgangswert des Serumalbumins von 100 %.

Deshalb wurde bei der Durchführung der weiteren Versuche als Elutionspuffer 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 plus 1,6 M NaCl gewählt.

3.3.4 Abhängigkeit der 5-HMF-Bildung von der Proteinkonzentration

Um die Rolle verschiedener Albuminkonzentrationen im Hinblick auf die HMF-Messung zu testen, wurde eine Versuchsreihe mit neun verschiedenen Albuminkonzentrationen zwischen 5 und 20 mg/ml Albumin durchgeführt.

9 ml Serum einer Normalperson wurden dialysiert, jeweils 1 ml chromatographiert und die Elutionsfraktionen 4 - 9 gepoolt. Anschließend wurden die neun gepoolten Eluate auf nachfolgende Konzentrationen eingeeengt: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 20 mg Albumin pro ml.

Die Auswertung der danach durchgeführten HMF-Messung zeigte eine linear-proportionale Abhängigkeit der HMF-Bildung von der Albumin-Konzentration (vgl. Abb. 11).

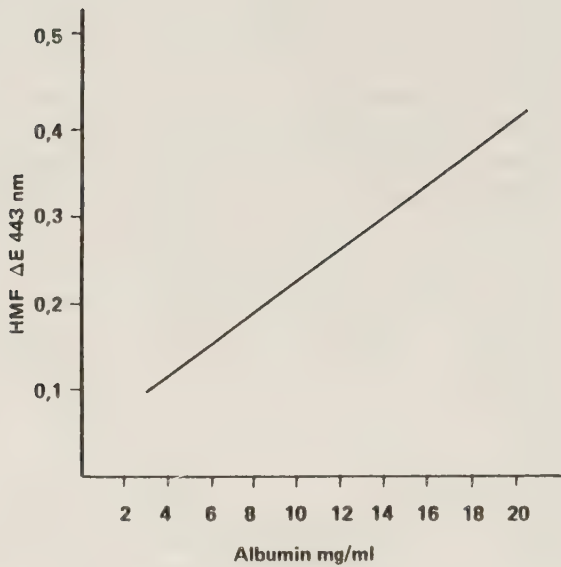


Abb. 11: HMF-Bildung bei verschiedenen Albumin-Konzentrationen

Bei der Langzeitstudie wurden die eluierten gepoolten Fraktionen aus praktischen Erwägungen auf 10 mg/ml Albumin eingeeengt.

3.4 Fließschema zur Bestimmung des glykosylierten Albumins

6 ml Plasma in 1000 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 12 Stunden bei +5 °C dialysieren



7 ml "Affi Gel Blue" auf die Chromatographiesäule geben



mit 14 ml Phosphatpuffer pH 6,8 vorspülen



1 ml dialysiertes Plasma auf die Säule pipettieren und mit 14 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 übrige Serumproteine eluieren.



mit 14 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 + 1,6 M NaCl das Albumin eluieren und in Fraktionen à 1 ml auftragen



Chromatographiesäulen mit 12 ml 8 M Harnstoff in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 regenerieren



Fractionen 4 - 9 poolen und Albuminkonzentration messen



Eluat in die Molekularfiltrationszellen mit Millipore Membranen P5ED auf eine Konzentration von 10 mg/ml einengen



Zur Säurehydrolyse 400 μ g konzentriertes Eluat mit 60 μ l Eisessig mischen



24 Stunden lang im Eppendorf Wärmeblock bei 92 ° C erhitzen



5 Minuten im Eisbad kühlen



100 μ l 3 M Trichloressigsäure zugeben, mischen



10 Minuten bei 8854 g (12.000 U/min.) zentrifugieren



400 μ l Oberstand abpipettieren, 200 μ l 0,05 M Thiobarbitursäure zugeben



30 Minuten bei 40 ° C im Hitzeblock inkubieren



ΔE bei 443 nm im Photometer messen.

$$\Delta E \times 350 = \frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{mmol Albumin}}$$

3.5 Bestimmung der glykosylierten Serumproteine

Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurde das dialysierte Plasma mit 0,9 % NaCl auf eine Eiweißkonzentration von 5 mg/ml verdünnt. Je 400 μl davon wurden mit 60 μl Eisessig gründlich gemischt und 24 Stunden im Hitzeblock bei 92 °C inkubiert.

Danach folgte der Thiobarbitursäure-Assay wie in Punkt 3.4.3 beschrieben.

3.6 Weitere Labormethoden

3.6.1 Glykosyliertes Hämoglobin (HbA₁)

HbA₁ wurde mit der Mikrosäulen-Technik mit Aldimin-Eliminator bestimmt; dazu wurde das Isolab "Fast Hämoglobin Test System" von Panchem (Kleinwallstadt) verwendet.

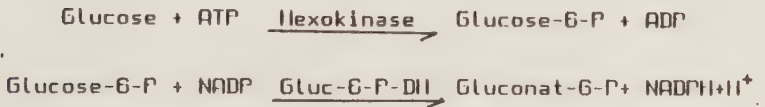
50 µl EDTA-Blut werden mit 100 µl Aldimin-Eliminator vermischt und 10 Minuten stehengelassen. Nach Verdünnung mit 100 µl Aqua dest. werden davon 50 µl auf die Harzsäule pipettiert. Mit 4 ml Elutionslösung Nr. 1 wird die "schnellwandernde HbA₁-Fraktion" ausgewaschen (Lösung A). Die andere Hb-Fraktion wird mit 4 ml Elutionsreagenz Nr. 2 ausgespült und mit 16 ml H₂O verdünnt (Lösung H).

Die Absorption beider Fraktionen wird bei 415 nm gemessen, als Leerwert dient H₂O. Der prozentuale HbA₁-Anteil wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A}{A + 5H} \times 100 \% = \% \text{ HbA}_1$$

3.6.2 Serumzucker

Die Bestimmung erfolgte nach der Hexokinase-Methode von Boehringer Mannheim mit 50 µl Serum nach folgendem Prinzip:



wobei die gebildete Menge NADPH aus der Extinktionszunahme bei 365 nm errechnet wird.

3.6.3 Serumelektrophorese

Die Elektrophorese der Serumproteine wurde mit der klinischen Routinemethode durchgeführt: die Färbung erfolgte nach Ponceau S, zur Auftragung wurden Acetatfolien verwendet.

3.6.4 Serumproteinbestimmung

Sie erfolgte unter Verwendung des Testkits von Merck Darmstadt. 200 µl des chromatographierten Eluats werden mit 1000 µl Perchlorsäure 0,66 M vermischt und 10 Minuten stehengelassen. Nach Zentrifugieren und Abpipettieren des Oberstands werden 1000 µl Diuret-Lösung zugegeben, gründlich aufgeschüttelt und nach 30 Minuten die Extinktion bei 546 nm abgelesen.

Die Konzentration wurde unter Mitverwendung eines Standards nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{600}{\text{Standard}} \times \Delta E$$

3.7 Korrelationsberechnungen (Stoffwechselparameter)

Die folgenden Tabellen zeigen die Korrelationen, die zwischen den Parametern Glucose, GSA, GSP und HbA_{1c} bestehen.

Die Daten stammen von 15 insulinpflichtigen Diabetikern, die regelmäßig die Diabetiker-Ambulanz aufsuchen (vgl. Tabelle 5) und 14 gesunden Kontrollpersonen (vgl. Tabelle 6). Bei jeder Untersuchung wurden die postprandiale Serumglucose, HbA_{1c} und glykosyliertes Albumin bestimmt; die Messung des glykosylierten Serumproteins wurde nur bei einem Teil der Probanden (n=13) durchgeführt.

Die Bestimmung der Parameter erfolgte mehrmals (3-6 mal) bei beiden Kollektiven, jeweils im Abstand von zwei bis acht Wochen (Tab. 7).

Zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten bei zweiseitiger Fragestellung wurden Einzelwerte desselben Untersuchungstages als Wertepaare eingegeben.

Patient	Ge- schlecht	Alter (J.)	Diabetes- dauer (J)	Spät- symptome	% Ideal- gewicht
I.D.	w	29	14	R	100
N.D.	m	49	10	R, Neu	113
M.G.	w	58	29	R, Neu	102
E.H.	m	39	15	R, Neu	100
E.K.	w	22	11	-	108
A.L.	m	27	10	-	90
A.S.	m	38	7	-	107
E.W.	m	41	24	R, Neu	111
T.M.	m	36	0,5	-	95
K.L.	w	61	7	R	84
S.M.	m	35	19	R	120
P.D.	m	44	12	R	86
Z.S.	w	16	1,5	-	103
K.L.	m	55	19	R	122
B.I.	m	40	3	-	113
MW+SEM		39 ± 3,3	12 ± 2,1		104 ± 2,9

Tabelle 5: Klinische Daten der diabetischen Patienten (n=15), bei denen Glucose, HbA_{1c}, GSA und GSP bestimmt wurden.

R = Retinopathie, Neu = Neuropathie.

Proband	Geschlecht	Alter (Jahre)	% Ideal- gewicht	Kontrolle für
K.N.	w	28	102	I.D.
M.I.	m	43	99	E.H.
S.B.	w	23	98	E.K.
B.T.	m	27	88	L.A.
L.R.	m	43	92	A.S.
M.O.	m	43	110	E.W.
G.R.	m	35	110	T.M.
R.H.	w	22	102	K.E.
R.P.	w	56	109	K.L.
W.A.	m	33	97	S.M.
K.O.	m	40	109	P.D.
A.C.	w	17	98	Z.S.
D.F.	m	53	115	K.L.
H.K.	m	41	125	B.I.
MW±SEM		30 ± 3,1	104 ± 2,6	

Tabelle G: Daten der gesunden Kontrollpersonen (n=14), bei denen Glucose, GSA und GSP bestimmt wurden.

	alle Diabetiker n = 15	Diabetiker ⊖ n = 6	Diabetiker ⊕ n = 9	Normalpersonen n = 14
HbA ₁ in %	10,0±0,25	9,5±0,3	10,2±0,4	6,3±0,14
$\frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{mmol Alb}}$ GSA	129±3,2	128±3,7	130±4,5	97±2,0
Glucose mg/dl	189±9,3	201±12,0	181±12,0	100±3,1
$\frac{\text{nmol HMF}}{\text{mg Prot.}}$ GSP	0,59±0,04	-	-	0,42±0,03

Tabelle 7: Mittelwerte der Stoffwechselparameter (MW±SEM), aus deren Einzelwerten die Korrelationen berechnet wurden.

Diabetiker ⊖: Diabetiker ohne Spätkomplikationen

Diabetiker ⊕: Diabetiker mit Spätkomplikationen

Zwischen den HbA₁ -Werten und denjenigen des glykosylierten Albumins (GSA) fand sich eine hochsignifikante Korrelation ($P < 0,001$) sowohl im Gesamtkollektiv aller Diabetiker (Tab. 8) als auch bei den Untergruppen der Diabetiker mit bzw. ohne Spätkomplikationen (Tab. 9 und 10 und Abb. 10).

	HbA ₁	GSA	GSP
Glucose	n.s. (63)	r = 0,358 (65) p < 0,01	r = 0,573 (12) p < 0,05
HbA ₁	--	r = 0,571 (59) p < 0,001	r = 0,735 (7) p < 0,05

Tabelle 8: Korrelationen der Stoffwechselfparameter bei allen Diabetikern (n=15). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der einzelnen Wertepaare an.

Beim Vergleich des glykosylierten Albumins (GSA) mit der Serumglucosekonzentration fand sich eine signifikante Korrelation bei der Gruppe aller Diabetiker (vgl. Tab. 8 und Abb. 17) und bei den Diabetikern ohne Spätkomplikationen (vgl. Tab. 9), wohingegen die HbA₁-Werte nur in der Untergruppe der Diabetiker ohne Spätsymptome mit den Glucosespiegeln korrelierten. Glykosyliertes Serumprotein (GSA) korrelierte ebenfalls mit HbA₁ sowie mit den Glucosewerten in der Gruppe aller Diabetiker (vgl. Tab. 8).

	HbA ₁	GSA
Glucose	$r = 0,584 (21)$ $p < 0,01$	$r = 0,659 (24)$ $p < 0,001$
HbA ₁	--	$r = 0,656 (20)$ $p < 0,001$

Tabelle 9: Diabetiker ohne Spätkomplikationen (n=6);
Zahlen in Klammern = Wertepaare.

	HbA	GSA
Glucose	n.s. (42)	n.s. (41)
HbA	--	$r = 0,541 (39)$ $p < 0,001$

Tabelle 10: Diabetiker mit Spätkomplikationen (n=9);
Zahlen in Klammern = einzelne Wertepaare.

Korrelationen, die für die Werte des GSA, GSP und Glucose des Normalkollektivs berechnet wurden, ergaben in keinem Fall statistisch signifikante Ergebnisse.

GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PUNKTWOLKE.
DIE VERBINDUNG DER BEIDEN Y ERGIBT DIE REGR.GER. (Y NACH X). ANALOG FÜR DIE BEIDEN X (X NACH Y).

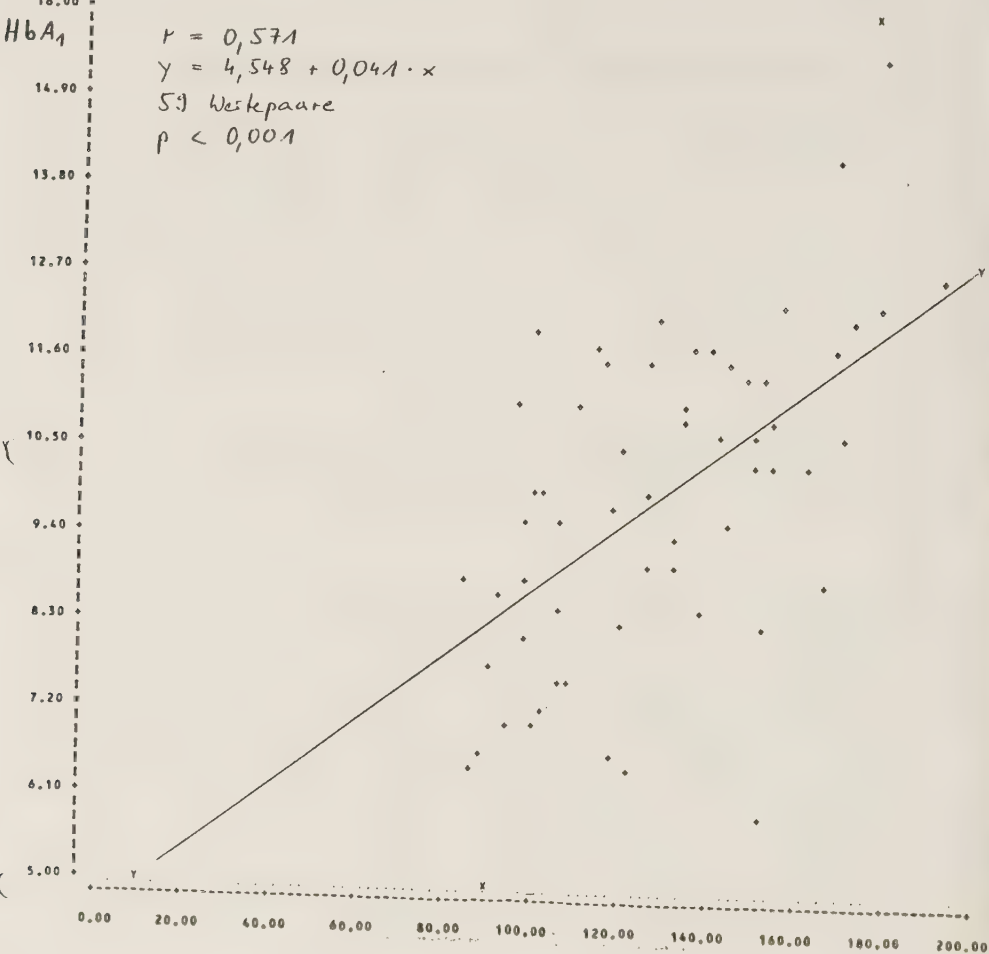
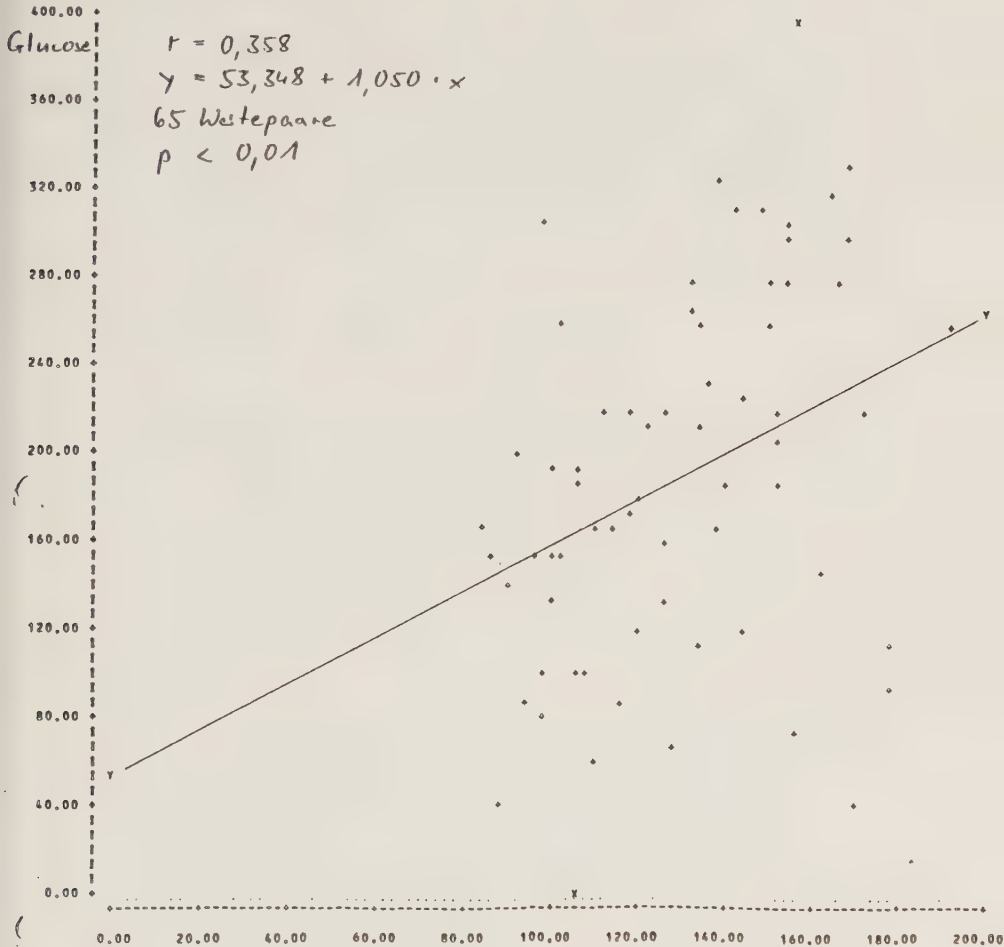


Abbildung 12: Korrelation zwischen den HbA₁-Werten
(9,9±1,7 MW±SD) und glykosyliertem
Serumalbumin (GSA, 120±23 MW±SD)
bei insulinpflichtigen Diabetikern.

GSA

GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PUNKTWOLKE.
DIE VERBINDUNG DER BEIDEN Y ERGIBT DIE REGN.GER. (Y NACH X), ANALOG FÜR DIE BEIDEN X (X NACH Y).



GSA

Abbildung 13: Korrelation zwischen Blutglucosekonzentration (189 ± 75 MW $\pm$ SD) und glykosyliertem Serumalbumin (GSA, 129 ± 26 MW $\pm$ SD) bei insulinpflichtige Diabetikern.

3.8 Qualitätskontrolle

Bei der Albuminchromatographie ergab sich eine durchschnittliche Ausbeute im Eluat von $91,5 \% \pm 8,6$ ($MW \pm SD$, $n=29$). Der Variationskoeffizient für sechsmalige Bestimmung des GSA von Proben derselben Versuchsperson ($n=3$) lag bei $\pm 5,2 \%$.

4 LANGZEITSTUDIE

4.1 Versuchsanordnung und Patienten

Die Patienten und Normalpersonen wurden zu Beginn der Studie gründlich informiert und gaben ihr Einverständnis.

4.1.1 Patientenkollektiv

Die Patientengruppe umfaßte zehn insulinpflichtige Diabetiker, die in Abständen von 8 -12 Wochen die Diabetes-Ambulanz der Medizinischen Klinik Innenstadt in München aufsuchten (Details siehe Tab. 11). Das Durchschnittsalter betrug 38 Jahre (16 - 61), die durchschnittliche Diabetesdauer 10 Jahre (0,5 - 19). Die zehn Patienten waren individuell eingestellt mit zwei bis drei täglichen Insulininjektionen.

Eine ophthalmoskopisch diagnostizierte Retinopathie lag bei fünf Patienten vor, zusätzlich fanden sich bei einem Diabetiker Symptome einer Polyneuropathie. Die Kreatininwerte lagen alle im Normalbereich. Ein Patient konnte nur zweimal untersucht werden. Diabetiker, die Medikamente eingenommen hatten, die Einfluß auf die Thrombozytenfunktion zeigen, wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Pa- tient	Ge- schlecht	Alter (J.)	Diab. dauer	Spät- sympt.	% Ideal- gewicht	Einheiten Insulin
T.M.	m	36	0,5	-	95	36 - 20
K.E.	w	23	12	-	107	35 - 10
H.E.	m	39	15	R, Neu	100	20 - 12
K.L.	w	61	7	R	84	14- 2 -6
S.M.	m	35	19	R	120	22 - 18
P.D.	m	44	12	R	86	26 - 8
Z.S.	w	16	1,5	-	103	34 - 14
K.L.	m	55	19	R	122	24 - 0
B.I.	m	40	3	-	113	18 - 10
L.A.	m	27	10	-	90	24 - 16
MW±SEM						
		38±4,3	10±2,1	102±4,3		

Tabelle 11: Klinische Daten der Diabetiker, die an der Langzeitstudie teilnahmen.

R = Retinopathie, Neu = Neuropathie

4.1.2 Kontrollpersonen

Für jeden Patienten, der in die Langzeitstudie aufgenommen wurde, wurde eine gesunde Kontrollperson mitgeführt, die ihm in Geschlecht, Gewicht und Alter jeweils entsprach (vgl. Tab. 12). Thrombozytenaggregation und glykosyliertes Albumin wurden in denselben Zeitabständen wie bei den Diabetikern gemessen. Die Probanden wurden unterrichtet, in den

beiden letzten, der Untersuchung vorausgehenden Wochen, keine Medikamente einzunehmen, die einen Einfluß auf die Thrombozytenfunktion zeigen, insbesondere kein Aspirin.

Proband	Geschlecht	Alter (Jahre)	% Ideal- gewicht	Kontrolle für
G.R.	m	35	110	T.M.
R.H.	w	22	102	K.E.
L.R.	m	43	92	H.E.
R.P.	w	56	109	K.L.
W.A.	m	33	97	S.M.
K.O.	m	40	109	P.D.
A.C.	w	17	98	Z.S.
D.F.	m	53	115	K.L.
H.K.	m	41	125	D.I.
B.T.	m	27	88	L.A.
MW±SEM		37±4,0	105±3,6	

Tabelle 12: Daten der gesunden Kontrollpersonen, die an der Langzeitstudie teilnahmen.

4.1.3 Versuchsablauf

Bei zehn Diabetikern und zehn Kontrollpersonen erfolgte in einem Zeitraum von 24 Wochen dreimal - im Abstand von 8 - 12 Wochen - eine Blutentnahme von insgesamt 25 ml. Diese wurde vormittags ein bis vier Stunden postprandial bei den gleichen Probanden möglichst zur selben Uhrzeit durchgeführt, um Tageszeitschwankungen der Bestimmung der Parameter zu verringern. Genau 35 Minuten danach wurde mit den Thrombozytenaggregationsmessungen begonnen. Das Serum zur Bestimmung von glykosyliertem Albumin oder glykosyliertem Gesamtprotein wurde nach zwölfstündiger Dialysierung gegen 1000 ml 0,02M Phosphatpuffer pH 6,8 bei 5°C bis zur Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Zudem wurden an jedem Versuchstag HbA_{1c}, Glucose und Gesamteiweiß bestimmt und eine Proteinelektrophorese durchgeführt. Glykosyliertes Serumprotein (GSP) wurde nur bei fünf Diabetikern und acht Normalpersonen gemessen.

4.2 Ergebnisse der Langzeitstudie

4.2.1 Stoffwechselfparameter: Vergleich zwischen den einzelnen Untersuchungen

Glykosyliertes Albumin, Serumglukose und HbA_{1c} wurden bei Diabetikern und Normalpersonen je dreimal im Abstand von 8 - 12 Wochen bestimmt (U1, U2, U3).

4.2.1.1 Diabetiker insgesamt

In der Gruppe aller zehn Diabetiker betrug der Mittelwert des glykosylierten Albumins bei der ersten Untersuchung $149 \pm 9,2$, fiel bei der zweiten auf $124 \pm 9,8$ ab, wobei die Differenz statistische Signifikanz zeigt. Am dritten Untersuchungstag läßt sich wieder ein Anstieg auf $136 \pm 9,7$ verzeichnen (vgl. Tab. 13). Auch die HbA_{1c}-Werte zeigten eine Abnahme von $10,8 \pm 1,0$ auf $8,9 \pm 0,6$. Bei der dritten Messung fand sich ein Mittelwert von $10,0 \pm 0,9$.

Die postprandialen Serumglucosewerte ergaben ähnliche Resultate; hier sank ebenfalls der Mittelwert von $150 \pm 29,5$ mg/dl auf $132 \pm 30,0$ bei der zweiten Bestimmung, doch lag bei der dritten Untersuchung der Mittelwert mit $187 \pm 26,6$ mg/dl am höchsten. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstagen waren bei den HbA_{1c}- und Glucosewerten nicht signifikant.

	U1	U2	U3
$\frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{GSA} \quad \text{mmol Alb}}$	149 $\pm$ 9,2	124 $\pm$ 9,8 *	136 $\pm$ 9,7
HbA ₁ in %	10,8 $\pm$ 1,0	8,9 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,9
Glucose mg/dl	158 $\pm$ 29,5	132 $\pm$ 30,0	187 $\pm$ 26,6

Tabelle 13: Stoffwechselfparameter aller Diabetiker (n=10, MW $\pm$ SEM) der drei Untersuchungstage (U1, U2, U3).

* = p < 0,05 im Vergleich mit U1.

4.2.1.2 Diabetiker ohne Spätkomplikationen

In der Untergruppe der fünf Diabetiker ohne Spätkomplikationen lag der Mittelwert der GSA bei der ersten Bestimmung mit 135 $\pm$ 11,5 am höchsten, fiel dann auf 122 $\pm$ 11 am zweiten und auf 121 $\pm$ 11,5 am dritten Versuchstag (vgl. Tab. 14). Bei den HbA₁-Werten war der Abfall von 10,5 $\pm$ 0,8 auf 8,3 $\pm$ 0,8 bei der zweiten Bestimmung statistisch signifikant mit p < 0,05. Bei der dritten Messung war ein geringfügiger Anstieg auf 8,8 $\pm$ 0,7 zu verzeichnen.

Die postprandialen Serumglucosewerte betrugen zu Beginn der Untersuchung im Mittel $188 \pm 42,5$ mg/dl, stiegen dann auf $204 \pm 47,9$ mg/dl am zweiten und waren mit $172 \pm 33,4$ am dritten Untersuchungstag unter den Ausgangswerten.

	U1	U2	U3
$\frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{GSA} \quad \text{mmol Alb}}$	$135 \pm 11,5$	$122 \pm 11,0$	$121 \pm 11,5$
HbA _{1c} in %	$10,5 \pm 0,8$	$8,3 \pm 0,8$ *	$8,8 \pm 0,7$
Glucose mg/dl	$18 \pm 42,5$	$204 \pm 47,9$	$172 \pm 33,4$

Tabelle 14: Stoffwechselfparameter der Diabetiker ohne Spätkomplikationen an den drei Untersuchungstagen (U1, U2, U3).

* = $p < 0,05$ im Vergleich mit U1.

4.2.1.3 Diabetiker mit Spätkomplikationen

In der Untergruppe von fünf Diabetikern mit Spätkomplikationen betrug das glykosylierte Albumin bei der ersten Untersuchung im Mittel $163 \pm 12,5$ und fiel dann auf $126 \pm 17,6$ (vgl. Tab. 15). Demgegenüber war bei der dritten Bestimmung wieder eine Erhöhung auf $155 \pm 11,1$ zu verzeichnen.

Die HbA₁-Mittelwerte verhielten sich ähnlich: beim ersten Versuchstag lagen sie bei $10,7 \pm 1,7$, nahmen dann ab auf $9,2 \pm 1,0$, um am dritten Versuchstag auf $11,6 \pm 0,6$ anzusteigen. Die postprandiale Serumglucose zeigte ein anderes Verhalten: der Unterschied zwischen erster und zweiter Bestimmung war gering mit einem Mittelwert von $128 \pm 40,7$ versus $120 \pm 29,6$. Demgegenüber fand sich bei der dritten Bestimmung ein wesentlich höherer Mittelwert von $206 \pm 46,9$.

	U1	U2	U3
$\frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{GSA} \quad \text{mmol Alb}}$	$136 \pm 12,5$	$126 \pm 17,6$	$155 \pm 11,1$
HbA ₁ in %	$10,7 \pm 1,7$	$9,2 \pm 1,0$	$11,6 \pm 0,6$
Glucose mg/dl	$128 \pm 40,7$	$120 \pm 29,6$	$206 \pm 46,9$

Tabelle 15: Stoffwechselfparameter der Diabetiker mit Spätkomplikationen (n=5, MW±SEM) an drei Untersuchungstagen (U1, U2, U3).

4.2.1.4 Normalpersonen

Für jeden in die Studie aufgenommen Diabetiker wurde eine Kontrollperson mitgeführt und die Untersuchungen in denselben Zeitabständen durchgeführt. Hier ergaben sich naturgemäß die geringsten Schwankungen bei den Meßwerten der Stoffwechselparameter (vgl. Tab. 10). Für GSA fand sich zu Beginn ein Mittelwert von $99 \pm 3,5$, der sich dann leicht erhöhte auf $106 \pm 4,8$ und bei der dritten Bestimmung bei $95 \pm 6,2$ lag.

Die postprandialen Serumglucosewerte lagen zu Beginn bei $95 \pm 3,4$, bei der zweiten Bestimmung bei $101 \pm 4,3$ und am dritten Versuchstag fand sich ein Mittelwert von $106 \pm 6,2$.

	U1	U2	U3
umol HMF GSA mmol Alb	$99 \pm 3,5$	$106 \pm 4,8$	$95 \pm 6,2$
HbA _{1c} in %	$6,3 \pm 0,1$	n.b.	n.b.
Glucose mg/dl	$95 \pm 3,4$	$101 \pm 4,3$	$106 \pm 6,2$

Tabelle 10: Stoffwechselparameter der Normalpersonen (n=10, MW $\pm$ SEM) an drei Untersuchungstagen (U1, U2, U3).
n.b. = nicht bestimmt.

4.2.2 Thrombozytenaggregation: Vergleich zwischen den einzelnen Versuchstagen

Die Thrombozytenaggregation mit ADP, Kollagen, Arachidonsäure und spontan wurde bei den Probanden jeweils am selben Tag wie die Stoffwechselparameter gemessen.

4.2.2.1 Diabetiker insgesamt

Bei der Gruppe aller zehn Diabetiker waren die Schwankungen zwischen den drei Versuchstagen sowohl nach ADP-, Kollagen- und Arachidonsäurezugabe als auch bei der Spontanaggregation gering und in keinem Fall statistisch signifikant (vgl. Tab. 17). Auf die Werte nach Zugabe von Arachidonsäure wird an anderer Stelle näher eingegangen (siehe S. 82).

		U1	U2	U3
ADP	1,25 μ M/l	40 $\pm$ 4	36 $\pm$ 3	39 $\pm$ 5
	2,5 μ M/l	56 $\pm$ 4	54 $\pm$ 4	56 $\pm$ 5
Kolla- gen	0,625 μ g/ml	46 $\pm$ 6	53 $\pm$ 4	48 $\pm$ 6
	1,25 μ g/ml	60 $\pm$ 5	62 $\pm$ 2	57 $\pm$ 4
Arachidon- säure	300 μ g/ml	30 $\pm$ 10	27 $\pm$ 9	38 $\pm$ 9
	500 μ g/ml	37 $\pm$ 10	46 $\pm$ 6	36 $\pm$ 9
Spontan		12 $\pm$ 2	11 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2

Tabelle 17: Aggregationswerte (Änderung der Lichttransmission in %) bei allen Diabetikern (n = 10, MW $\pm$ SEM) an drei Untersuchungstagen (U1, U2, U3).

4.2.2.2 Diabetiker ohne Spätkomplikationen

In der Gruppe der Diabetiker ohne klinisch manifeste Mikroangiopathie ließ sich bei der ADP-induzierten Aggregation keine signifikante Änderung im Vergleich zum Ausgangswert feststellen (vgl. Tab. 18). Die Kollagen-induzierte Aggregation zeigte bei Verwendung der niedrigeren Konzentration zwischen Untersuchung 1 und 2 eine signifikante Zunahme von 40 ± 5 auf 50 ± 2 und blieb dann bei 54 ± 3 . Die Mittelwerte der höheren Konzentration waren an den drei Untersuchungstagen konstant. Bei Induzierung der Aggregation mit 300 $\mu\text{g/ml}$ Arachidonsäure ließ sich am dritten Untersuchungstag eine Zunahme der Mittelwerte von 27 ± 15 auf 41 ± 6 beobachten. Durch die große Streuung der Anfangswerte (Erläuterung siehe S. 80) ist diese Zunahme jedoch nicht signifikant. Die Zugabe von 500 $\mu\text{g/ml}$ führte zu einem Anstieg von 43 ± 16 auf 55 ± 2 , um dann jedoch auf 30 ± 11 abzufallen, wobei der Unterschied zwischen den Werten der zweiten und dritten Untersuchung mit $p < 0,05$ signifikant war.

Die Spontanaggregation zeigte zuerst eine Abnahme von 11 ± 4 auf 7 ± 2 , dann einen leichten Anstieg, wobei der U3-Wert niedriger lag als der Ausgangswert. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

4.2.2.3 Diabetiker mit Spätkomplikationen

Bei dieser Gruppe ließen sich sowohl bei der Spontanaggregation als auch bei der durch ADP, Kollagen und AA induzierten Aggregation keine signifikanten Unterschiede an den drei Untersuchungstagen feststellen (vgl. Tab. 19).

		U1	U2	U3
ADP	1,25 μ M/l	40 $\pm$ 5	33 $\pm$ 3	44 $\pm$ 7
	2,5 μ M/l	54 $\pm$ 7	50 $\pm$ 7	60 $\pm$ 5
Kollagen	0,625 μ g/ml	46 $\pm$ 5	56 $\pm$ 2 *	54 $\pm$ 3
	1,25 μ g/ml	61 $\pm$ 6	62 $\pm$ 3	59 $\pm$ 1
Arachidonsäure	300 μ g/ml	27 $\pm$ 15	25 $\pm$ 13	41 $\pm$ 6
	500 μ g/ml	43 $\pm$ 16	55 $\pm$ 2	30 $\pm$ 11 *
Spontan		11 $\pm$ 4	7 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2

Tabelle 18: Aggregationswerte bei Diabetikern ohne Spätkomplikationen (n = 5, MW $\pm$ SEM).

* = p < 0,05 im Vergleich mit U1

* = p < 0,05 im Vergleich mit U2.

		U1	U2	U3
ADP	1,25 $\mu\text{M/l}$	40 $\pm$ 7	40 $\pm$ 5	32 $\pm$ 5
	2,5 $\mu\text{M/l}$	58 $\pm$ 7	57 $\pm$ 5	51 $\pm$ 11
Kolla- gen	0,625 $\mu\text{g/ml}$	46 $\pm$ 11	51 $\pm$ 9	40 $\pm$ 13
	1,25 $\mu\text{g/ml}$	58 $\pm$ 7	61 $\pm$ 4	55 $\pm$ 8
Arachidon- säure	300 $\mu\text{g/ml}$	32 $\pm$ 14	28 $\pm$ 13	34 $\pm$ 19
	500 $\mu\text{g/ml}$	32 $\pm$ 14	38 $\pm$ 10	43 $\pm$ 16
Spontan		12 $\pm$ 3	15 $\pm$ 6	7 $\pm$ 3

Tabelle 19: Aggregationswerte bei Diabetikern mit Spät-
komplikationen (n = 5, MW $\pm$ SEM).

4.2.2.4 Normalpersonen

Die Gruppe der Normalpersonen ($n = 10$) zeigte bei ADP-induzierter Aggregation eine Zunahme der Meßwerte, wobei bei $2,5 \mu\text{M}$ ADP die Erhöhung des U3-Wertes im Vergleich zu beiden vorangegangenen Bestimmungen signifikant war ($p < 0,05$, vgl. Tab. 20). Bei Induzierung mit $1,25 \mu\text{M/l}$ ADP fand sich zuerst eine Abnahme von 30 ± 3 auf 25 ± 3 , dann ein signifikanter Anstieg auf 33 ± 4 ($p < 0,05$). Auch bei Kollagen-induzierter Aggregation zeigte sich eine Zunahme der Meßwerte: die Veränderungen waren bei der niedrigeren Kollagenkonzentration ausgeprägter, wobei die Zunahme von U1 zu U3 signifikant war mit $p < 0,05$. Bei den Messungen nach Zugabe von Arachidonsäure läßt sich im Gegensatz dazu eine starke Abnahme von U1 zu U2 bei beiden Konzentrationen feststellen, dann eine Zunahme auf 13 ± 7 bzw. 19 ± 8 .

Die Spontanreaktion zeigte eine signifikante Abnahme vom ersten zum zweiten Untersuchungstag und näherte sich bei U3 wieder dem Ausgangswert.

		U1	U2	U3
ADP	1,25 $\mu\text{M/l}$	30 $\pm$ 3	25 $\pm$ 3	33 $\pm$ 4*
	2,5 $\mu\text{M/l}$	41 $\pm$ 3	40 $\pm$ 4	52 $\pm$ 5*
Kolla- gen	0,625 $\mu\text{g/ml}$	27 $\pm$ 5	33 $\pm$ 6	43 $\pm$ 7 *
	1,25 $\mu\text{g/ml}$	54 $\pm$ 3	48 $\pm$ 4	57 $\pm$ 5
Arachidon- säure	300 $\mu\text{g/ml}$	25 $\pm$ 10	1 $\pm$ 1**	13 $\pm$ 7
	500 $\mu\text{g/ml}$	35 $\pm$ 9	6 $\pm$ 5***	19 $\pm$ 8
Spontan		6 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1*	5 $\pm$ 1

Tabelle 20: Thrombozytenaggregation der Normalpersonen
(n = 10, MW $\pm$ SEM).

* = p < 0,05 im Vergleich mit U1

* = p < 0,05, ** = p < 0,025, *** = p < 0,01
im Vergleich mit der vorangehenden Bestimmung.

4.2.3 Vergleich der Diabetikergruppe mit Normalpersonen

Für diesen Vergleich wurde bei allen vier Gruppen jeweils der Mittelwert aus sämtlichen Meßergebnissen der drei Untersuchungstage gebildet. Diese Zusammenfassung der Daten zur besseren Vergleichbarkeit war möglich, da die Schwankungen zwischen den drei Versuchstagen gering waren. Die Gruppe aller Diabetiker, der Diabetiker ohne Spätschäden und der Diabetiker mit Spätschäden wurde mit dem Normalkollektiv verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zwischen Diabetikern mit und ohne nachweisbare diabetischen Komplikationen.

Bei allen gemessenen Stoffwechselparametern zeigen die Diabetiker hochsignifikant höhere Werte. Dabei liegen die Daten für glykosyliertes Albumin und HbA_1 bei den Diabetikern ohne Spätkomplikationen niedriger ($12,0 \pm 9,9$ und $9,4 \pm 0,7$) als bei den Diabetikern mit Spätkomplikationen ($14,6 \pm 11,7$ und $10,8 \pm 1,3$), dieser Unterschied lag jedoch unter dem Signifikanzniveau.

In allen Gruppen zeigte sich bei höherer Aggregantienkonzentration eine stärkere Aggregation (vgl. Tab. 21). Die Gruppe aller Diabetiker zeigte im Vergleich mit Normalpersonen bei allen Aggregantien außer $1,25 \mu\text{g}$ Kollagen signifikant höhere Meßwerte als Normalpersonen. Die Zunahme bei $500 \mu\text{g}$ Arachidonsäure und bei der Spontanaggregation war besonders deutlich ($p < 0,01$).

Vergleicht man die Gruppe der Diabetiker ohne Spätkomplikationen mit den Diabetikern mit Spätkomplikationen, so läßt sich in keinem einzigen Fall ein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Die Meßdaten unterscheiden sich nur

geringfügig voneinander mit Ausnahme der Spontanaggregation, die bei Diabetikern ohne Spätkomplikationen bei $9 \pm 2 \%$ liegt, dagegen bei Diabetikern mit Spätkomplikationen bei $13 \pm 4 \%$.

Die Reaktivität der Thrombozyten nach Zugabe von Arachidonsäure wurde auch noch auf andere Weise berechnet: es wurde die Frequenz berechnet, mit der eine Aggregation in den verschiedenen Gruppen ausgelöst werden konnte.

Wie Tabelle 22 zeigt, tritt bei der Gruppe der Normalpersonen nur in 20 % der durchgeführten Messungen eine Aggregation nach Zugabe von Arachidonsäure ein, im Gegensatz zu 62 % bei den Diabetikern. In beiden Gruppen liegt der Prozentsatz bei Induzierung mit 500 $\mu\text{g/ml}$ AA höher als bei Aggregationsinduktion mit 300 $\mu\text{g/ml}$.

Teilt man das Diabetikerkollektiv in Gruppen mit und ohne Spätsymptome auf, so läßt sich sowohl hinsichtlich der Frequenz des Auftretens einer Aggregation als auch der Dosisabhängigkeit kein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellen

	Normal- personen n = 10	alle Dia- betiker n = 10	Diabetiker + n = 5	Diabetiker - n = 5
ADP 1,25 µM/l	29 ± 3	39 ± 3**	39 ± 5*	38 ± 4*
2,5 µM/l	44 ± 4	56 ± 4**	55 ± 6	56 ± 6*
Koll 0,625 µg/ml	35 ± 5	50 ± 5**	52 ± 5***	47 ± 10
1,25 µg/ml	53 ± 3	60 ± 3	61 ± 3	58 ± 6
AA 300 µg/ml	13 ± 5	31 ± 6**	31 ± 6**	31 ± 12
500 µg/ml	20 ± 4	40 ± 7***	43 ± 8***	37 ± 12
Spontan	5 ± 1	11 ± 2***	9 ± 2**	13 ± 4***
µmol HMF GSA ————— nmol Alb	101 ± 3,3	136 ± 8,0	120 ± 9,9	146 ± 11,7
HbA _{1c} in %	6,3 ± 0,1	9,9 ± 0,7	9,4 ± 0,7	10,8 ± 1,3
nmol HMF GSP ————— mg Protein	0,42 ± 0,03	0,62 ± 0,06	--	--
Glucose mg/dl	100 ± 3,1	166 ± 23,9	168 ± 30,3	144 ± 20,0

Tabelle 21: Vergleich der Diabetikergruppen mit Normalpersonen;
Mittelwerte der drei Untersuchungstage (MW±SEM).

* = p < 0,05

**** = p < 0,0005

** = p < 0,025

***** = p < 0,00005

*** = p < 0,01

	Normal- personen n = 10	alle Dia- betiker n = 10	Diabetiker ⊕ n = 5	Diabetiker ⊖ n = 5
Arachidonsäure insgesamt	28 % (60)	62 % (58)	63 % (30)	61 % (28)
AA 300 µg/ml	23 % (30)	52 % (29)	53 % (15)	50 % (14)
AA 500 µg/ml	33 % (30)	72 % (29)	73 % (15)	71 % (14)

Tabelle 22: Arachidonsäure-induzierte Aggregation; angegeben sind die positiven Antworten.
In Klammern steht die Gesamtzahl der Bestimmungen (pro Proband drei bzw. zwei).

5 DISKUSSION

5.1 Thrombozytenaggregation bei Normalpersonen

In unseren Versuchen zeigte sich eine deutliche Abnahme der ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation mit zunehmendem Zeitintervall nach Blutabnahme, wobei berücksichtigt werden muß, daß die erste Messung in der Regel 90 Minuten nach Venenpunktion stattfand (vgl. 2.4.1). Bei niedrigerer ADP-Konzentration (2,5 $\mu\text{M/l}$) ist die Aktivitätsminderung stärker als bei Induzierung mit höherer Konzentration (5 $\mu\text{M/l}$ ADP).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von WARLOW et al. (145), die bei vergleichbaren Konzentrationen von ADP und Kollagen eine ähnlich ausgeprägte Abnahme der Thrombozytensensibilität in der Zeit ergaben. DREDDIN et al. (16) hingegen beschrieben eine Zunahme der Aggregationstendenz in den ersten zwei Stunden nach Blutentnahme. Betrachtet man jedoch die 180-Minuten-Werte für Kollagen, so liegen sie deutlich niedriger als die Werte, die DREDDIN et al. 120 Minuten nach Abnahme gemessen hatten. Weitere Autoren, die von der Zeitabhängigkeit der Aggregation berichten, fordern deshalb Zeitangabe oder Standardisierung für durchgeführte Tests (15, 108, 133).

Die Ursachen für das veränderte Plättchenverhalten sind wenig klar; es werden Veränderungen der ADP-abbauenden Plasmaenzyme diskutiert (145) oder Änderungen der Membranpermeabilität für ADP (16). Denkbar wäre auch eine Abnahme der metabolischen Aktivität mit Entleerung der ATP-Vorräte der Plättchen

bei langandauernder ex vivo Aufbewahrung, da ein basaler ATP-Spiegel Voraussetzung für shape-change und Aggregation ist (140). Zudem scheint eine ungeminderte Energiegewinnung durch Glykolyse nur für 60 bis 90 Minuten nach Venenpunktion gewährleistet zu sein (75). Aus diesen Überlegungen heraus wurden die Aggregationsmessungen bei der Langzeitstudie innerhalb von 85 Minuten ausgeführt.

Der Einfluß der Inkubationstemperatur auf das Aggregationsverhalten wurde bei 4°C, 22°C und 37°C untersucht. Aufbewahrung des standardisierten Plasmas bei 37 ° C führte zu schnellerer Minderung der Thrombozytenaktivität als Inkubierung bei Raumtemperatur (22 °C); bei niedrigerer Temperatur zeigte sich nach Aufwärmen eine leicht verstärkte Aggregation (vgl. 2.4.2). MUSTARD (105) und BREDDIN et al. (16) berichten über ähnliche Tendenzen bei Temperaturveränderung: Aufbewahrung bei 37°C minderte sowohl die ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation als auch die Spontanaggregation (17). Hier ist eine Aktivierung der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Enzyme mit Substratverbrauch bei 37°C denkbar. Eine Zunahme der Aggregation nach Abkühlung des standardisierten Plasmas und Wiederaufwärmen wurde häufig beschrieben (14, 70, 113); unter anderem durch Bereitstellung von "Fibrinrezeptoren" auf der Plättchenmembran (113) und Konservierung von Substrat bei 4°C.

Bei unseren Untersuchungen zum Einfluß der Thrombozytenkonzentration auf die Zunahme der Lichttransmission stellten wir sowohl bei Induzierung mit ADP als auch mit Kollagen in maximalen Dosen eine lineare Abhängigkeit fest (vgl. 2.4.3). Bei den Versuchen wurde deshalb jedes plättchenreiche Plasma auf 200.000

Thrombozyten pro μ l verdünnt, um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Präparationen zu ermöglichen. Von vergleichbaren Resultaten berichten SIESS et al. (133) bei Verwendung von Kollagen, während PACKHAM et al. (108) auch bei Kollagen eine gleichbleibende Thrombozytenzahl für weniger bedeutend erachtet.

Eine Zunahme der Aggregation bei steigender Aggregantienkonzentration konnte durch unsere Experimente eindeutig belegt werden. ADP in niedrigeren Konzentrationen (0,625 μ M) bewirkte eine reversible Aggregation, von 1,25 bis 2,5 μ M trat eine irreversible submaximale Aggregation auf, ab 5 μ M eine maximale (vgl. 2.4.6). Ein ähnliches Profil fand sich für Kollagen, wobei der niedrigsten Konzentration von 0,625 μ g meist Desaggregation folgte und eine Maximalaggregation ab 2,5 μ g stattfand. SCHAEFER et al. (128), ARDLIC et al. (3) und BREDDIN et al. (16) konstatierten dieselben charakteristischen Veränderungen der Aggregationskurven bei steigender ADP-Konzentration. Eine ähnliche Dosisabhängigkeit bei Kollagen beschrieben PACKHAM (108) und SIESS et al. (133); letztere Aggregationswerte bei maximaler Stimulation stimmen mit den hier beschriebenen überein.

5.2 Glykosylierte Proteine

Viele Publikationen zur Proteinglykosylierung waren methodischen Fragen gewidmet.

Der erste strittige Punkt war die Zeitdauer der Säurehydrolyse. WIELAND et al. (148) konnten nachweisen, daß eine lineare Abhängigkeit zwischen der Dauer der Hydrolyse bis zu 50 Stunden und HMF-Ertrag

besteht. Dies kompliziert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Autoren, da mit Hydrolysezeiten von 2h (153), 4.5h (95, 89), 5h (8) bis zu 24h (37) gearbeitet wurde.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Bestimmung des glykosylierten Albumins respektive des glykosylierten Gesamtproteins ist die Protein- oder Albuminkonzentration der zu untersuchenden Proben: wir fanden bei unseren Versuchen mit Albuminkonzentrationen zwischen 5 und 20 mg/ml eine lineare Abhängigkeit der IMF-Bildung von der Eiweißkonzentration (vgl. 3.3.4). Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten von DOLHOFFER et al. (39) überein, die gleichfalls bei steigender Albuminkonzentration höhere IMF-Erträge beschrieben. Somit ist es notwendig, den Eiweißgehalt der Proben vor Assaybeginn zu standardisieren. In dieser Studie erwiesen sich 10 mg/ml als praktikabel.

Die Arbeitsgruppe von KENNEDY (81) wies darauf hin, daß eine vorherige Dialyse des Serums unbedingt erforderlich ist. In Versuchsreihen mit Normalseren fanden sie eine Erhöhung von 241 % der Basalspiegel an GSP, wenn kurz vor Versuchsbeginn Glucose in einer Konzentration von 300 mg/dl zugefügt worden war. Als Erklärung dafür vermuteten sie, daß bei der hohen Hydrolysetemperatur die nonenzymatische Bindung freier Glucose an Proteine verstärkt abläuft. Es ist jedoch nachgewiesen, daß bei hohen Temperaturen und Säurezugabe Hexosen und Pentosen allein, ohne die katalytische Wirkung von Aminosäuren und Proteinen, zu IMF reagieren können (64). Die Serumproben wurden deshalb 12 Stunden lang bei +4 C dialysiert.

Nach Durchführung dieser Studie wurde eine andere Methode zur Bestimmung glykosylierter Proteine

veröffentlicht. Dabei wird das Abbauprodukt Furosin (c-N-(2-Furoyl-methyl)-L-Lysin), das nach 18-stündiger Hydrolyse bei 95°C in 6M HCL entsteht, gemessen (131). Diese Methode ist spezifischer als der Thiobarbitursäuretest, da sie ausschließlich die Ketoaminbindungen glykosylierter Proteine erfaßt.

Für den klinischen Routinegebrauch scheint die Bestimmung glykosylierter Gesamtproteine sinnvoller als die von Albumin, da die aufwendige und die Analysenzahl beschränkende Prozedur der chromatographischen Trennung wegfällt. Es reflektiert ebenso wie GSA den Grad der Hyperglykämie über einen Zeitraum von einigen Tagen bis zu zwei Wochen vor der Messung (130). Zwar stellt die Gesamtheit des Serumweißes eine Mischung an Proteinen mit unterschiedlichen Halbwertszeiten dar und die Glykosylierung von Immunglobulinen, Fibrinogen, Alpha-2-macroglobulin, Haptoglobulin u.a. scheint in unterschiedlicher Intensität abzulaufen (YUE 153), doch wird die Situation dadurch vereinfacht, daß glykosyliertes Albumin 90 % der glykosylierten Serumproteine darstellt (37).

Die Bestimmung des glykosylierten Albumins und Gesamtproteins erbrachte bei allen von uns untersuchten Diabetikergruppen signifikant höhere Werte als bei den Normalpersonen. Nur die GSA-Werte lagen in der Gruppe der Diabetiker mit Spätkomplikationen etwas höher ($146 \pm 11,7$) als bei Diabetikern ohne Spätkomplikationen ($126 \pm 9,9$), wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (vgl. 4.2.3).

Unsere Ergebnisse gleichen den Beobachtungen anderer Autoren, die bei Diabetikern eine verstärkte Proteinglykosylierung festgestellt hatten. DOLHOFFER et al. (39) fanden 1980 bei 65 Diabetikern mit einer

vergleichbaren Methode einen erhöhten Spiegel an Glycosyl-Albumin, KENNEDY und Mitarbeiter (79) berichteten 1981 von signifikant höheren GSP-Werten bei Diabetikern ($0,72 \pm 0,03$ nmol HMF/mg Protein) als bei Normalpersonen ($0,32 \pm 0,01$), doch vermißt man sowohl in diesen Studien wie auch in allen anderen uns vorliegenden Publikationen über Proteinglykosylierung (33, 58, 59, 78, 80, 81, 95, 140, 153) eine Charakterisierung des Diabetikerkollektivs und der gewonnenen Daten hinsichtlich des Auftretens oder Fehlens klinisch manifestierter Spätschäden.

Unsere statistischen Berechnungen zeigen eine signifikante Korrelation zwischen glykosyliertem Albumin und HbA ($r = 0,571$ mit $p < 0,001$) in allen Diabetikergruppen (vgl. 3.7). Diese Obereinstimmung der Stoffwechselfparameter mit verschiedenen Halbwertszeiten bei den von uns untersuchten Diabetikern ist verständlich, da die einzelnen Bestimmungen in größeren Zeitabständen stattfanden und das untersuchte Kollektiv keine neu diagnostizierten oder extrem instabile Diabetiker umfaßte. Unser Ergebnis gleicht den Resultaten von WICLAND et al. (140), die für die Beziehung zwischen HbA_{1c} und GSA ähnliche Werte konstatierten mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,79$ und $p < 0,01$.

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen glykosyliertem Gesamtprotein und HbA konnten wir ebenfalls eine signifikante Korrelation ($r = 0,573$ mit $p < 0,05$) nachweisen, die vergleichbar ist mit anderen Ergebnissen in der Literatur (58, 79).

Deutlich werden die unterschiedlichen Anwendungsbereiche dieser drei Stoffwechselfparameter bei Studien, die das Verhalten von GSA bzw. GSP und HbA_{1c} bei

ausgeprägter Einstellungsverbesserung innerhalb kurzer Zeit untersuchen: JONES et al. (71) bestimmten bei neu diagnostizierten Diabetikern GSA und HbA₁ in wöchentlichem Abstand und fanden nach vierwöchiger Therapie bei einer Abnahme des Nüchternblutzuckers um 72 % eine Reduzierung der GSA-Werte um 50 %, während die HbA₁-Werte nur um 39 % fielen, dieser Unterschied war statistisch signifikant. Ähnliche Ergebnisse konnten KENNEDY und MERIMCE (80) hinsichtlich der Beziehung zwischen GSP und HbA₁ nachweisen.

Somit zeigt sich klar, daß die Domäne der Bestimmung glykosylierter Proteine und Albumine in der Erfassung mittelfristiger Blutzuckerschwankungen über 1 - 3 Wochen liegt und in diesem Zeitraum den HbA₁-Messungen an Aussagekraft überlegen ist, da letztere eher einen langfristigen Indikator der Stoffwechsellage darstellen.

GSA und GSP (59) zeigen zudem Vorteile gegenüber der HbA₁-Messung in gewissen klinischen Situationen wie erhöhtes HbF, Schwangerschaft oder bei hämolytischen Krankheitsbildern mit veränderten Erythrozytenüberlebenszeiten.

5.3 Langzeitstudie

5.3.1 Thrombozytenaggregation bei Diabetikern

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Publikationen über die Thrombozytenaggregation bei Diabetikern, deren Resultate oft widersprüchlich sind. Die Daten über das Ausmaß der Aggregation sind schwer vergleichbar, da unterschiedliche Auswertungsweisen vorgenommen, verschiedene Aggregantien in stark differierenden Konzentrationen eingesetzt und die Abhängigkeit vom Zeitintervall nach Blutentnahme häufig nicht beachtet wurden (42, 63, 115). Zudem wurden diabetische Patienten häufig nicht in Untergruppen nach Vorkommen von Spätkomplikationen aufgeteilt (84), ebenso wurde die Qualität der Einstellung nicht beachtet, besonders in älteren Untersuchungen (115).

In unseren Versuchen zeigten Diabetiker eine signifikant erhöhte Aggregation gegenüber Normalpersonen bei der in vitro gemessenen Spontanaggregation (vgl. 4.2.3) und bei der durch ADP, Kollagen und Arachidonsäure in vitro induzierten Aggregation. Lediglich bei der Verwendung der höheren Kollagenkonzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ PRP blieb der Unterschied unter dem Signifikanzniveau. Dies dürfte damit zu erklären sein, daß die gewählte Kollagenkonzentration so hoch war, daß sie häufig auch schon bei Normalpersonen eine Maximalaggregation induzierte.

Betrachtet man die zwei Untergruppen der Diabetiker mit oder ohne klinisch manifeste Spätkomplikationen, so zeigt sich kein Unterschied im Aggregationsverhalten nach Aggregantienzugabe. Nur die Werte der Spontanaggregation, die in beiden Kollektiven signifikant

höher lagen als bei Gesunden, waren bei Diabetikern mit Spätsymptomen stärker erhöht als bei Probanden ohne Spätkomplikationen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden anderer Autoren. COLWELL et al. (29, 30) fanden bei allen Diabetikergruppen bis auf Prädiabetiker eine erhöhte ADP-Aggregation ohne jegliche Assoziation zu Retinopathie oder Nephropathie. Zudem fanden sie einen gesteigerten Prozentsatz an Megathrombozyten, der mit der Plättchenaggregation korrelierte. GENSINI et al. (55) untersuchten zirkulierende Plättchenaggregate und fanden schon bei Prädiabetikern einen erhöhten Index, der im klinischen Verlauf des Diabetes nicht weiter stieg. Am eindrücklichsten sind die Resultate von EWALD und Mitarbeitern (46), die bei Kindern mit Typ I-Diabetes ohne Vasculopathien eine erhöhte ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation nachweisen konnten. Diese Daten korrelierten weder mit Diabetesdauer noch mit der Qualität der Einstellung.

Andere Arbeitsgruppen fanden jedoch nur Veränderungen der Aggregation bei Diabetikern mit Spätkomplikationen, besonders bei Patienten mit Retinopathie (6, 53, 63). Daneben liegen auch Untersuchungen über eine normale Aggregation bei Diabetes mellitus vor. PORTA et al. (118) konnten bei Diabetikern mit verschiedenen Schweregraden einer Retinopathie keine signifikanten Veränderungen gegenüber Normalpersonen finden. Diese Resultate könnten durch die hohen Konzentrationen der verwendeten Aggregantien bedingt sein, die bei Kollagen ca. 1000 mal höher war als in unseren Versuchen, und so das Erkennen eines erniedrigten Schwellenverhaltens sicher ausschließen. Derselbe Mechanismus könnte auch bei FRITSCHI und Mitarbeitern (53) eine Rolle spielen, die ebenfalls

Über eine normale Aggregation nach Zugabe von 6,25 und 25 µg/Kollagen pro ml standardisiertes Plasma berichteten.

5.3.2 Arachidonsäure

Arachidonsäure, eine essentielle, vierfach ungesättigte Fettsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure), ist die Hauptvorstufe der Prostaglandine beim Menschen. Normale Plättchen enthalten 20 bis 30 µM Arachidonsäure, den Großteil davon in der Thrombozytenmembran. Dort wird sie aus Linolensäure synthetisiert (102) und ist in Esterform an die Phospholipide gebunden, vor allem an Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol (11). Arachidonsäure vermag selbst Aggregation und Freisetzungsreaktion auszulösen und wird dann sogleich durch die Cyclooxygenase verstoffwechselt; werden andere Aggregantien eingesetzt, so wird sie über Aktivierung der Phospholipase A aus dem Phospholipid-Pool freigesetzt (8).

In unseren Versuchen vermochte Arachidonsäure in zwei verschiedenen Konzentrationen sowohl bei Diabetikern als auch bei gesunden Probanden eine irreversible Aggregation auszulösen, doch nicht in allen Fällen. Nur knapp ein Drittel der Normalpersonen zeigte eine positive Antwort, bei den Diabetikern zwei Drittel.

In beiden Gruppen zeigte sich eine Dosisabhängigkeit: bei der höheren Konzentration von 500 µg/ml trat häufiger eine vollständige Aggregation auf (vgl. 4.2.3).

Von vergleichbaren Resultaten berichteten HALUSHIKA et al. (60) und COLWELL et al. (30, 31), die ebenfalls

eine erhöhte Sensibilität diabetischer Plättchen bei Aggregationsinduzierung mit Arachidonsäure nachweisen konnten. Eine erniedrigte Reaktionsschwelle bei Diabetes fanden auch KUDISZ et al. (84); Auslösung von 50 % der Maximalaggregation war durch niedrigere Arachidonsäurekonzentrationen möglich als bei Kontrollpersonen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Aktivität der membranständigen Cyclooxygenase oder Prostaglandin-Synthetase bei Diabetikern erhöht ist (106). Möglich wäre auch eine verstärkte Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden; diese Vorstellung wird durch die Daten von KALOFOUTIS (74) und TAKAHASHI et al. (140) unterstützt, die einen erhöhten Arachidonsäuregehalt der Thrombozytenmembran bei Diabetikern fanden und dies als Erklärung für den gesteigerten Prostaglandinstoffwechsel sehen.

5.3.3 Einfluß der Einstellung auf die Thrombozytenaggregation

Als weiterer Faktor, der die Thrombozytenaggregation bei Diabetikern beeinflussen könnte, wird die Güte der Einstellung diskutiert. Zur Klärung dieses Zusammenhangs sind Longitudinalstudien erforderlich, ihre Zahl in der Literatur ist jedoch gering, die Beobachtungsdauer kurz (6 - 8 Wochen) und die Ergebnisse sind äußerst widersprüchlich. In unserer Studie, die sich über sechs Monate erstreckte, ließ sich in der Gruppe aller Diabetiker keine signifikante Änderung der Thrombozytenaggregation und der Einstellung anhand der Stoffwechselparameter feststellen.

In der Untergruppe der Diabetiker ohne

Spätkomplikationen zeigen jedoch die Werte von HbA_1 und GSA eine Verbesserung der Einstellung an, wobei die Abnahme des HbA_1 -Wertes von der ersten zur zweiten Untersuchung signifikant ist. Demgegenüber zeigt die Aggregation keine Änderung, lediglich nach Stimulierung mit $0,625 \mu\text{g}$ Kollagen ist eine Zunahme zu verzeichnen ($p < 0,05$).

In der Literatur sind die Befunde widersprüchlich: DEMMEL et al. (36) fanden eine verminderte Thrombozytenaggregation bei schlechter Stoffwechseleinstellung und nach weitgehender Normalisierung der Blutglucosekonzentration nach zweiwöchiger Therapie einen signifikanten Anstieg der Thrombozytenaggregation nach ADP-, Kollagen- und Adrenalinzugabe. JACKSON et al. (38) berichteten von einer signifikanten Zunahme der Plättchenreaktivität auf ADP und einer anhaltend erhöhten Sensibilität nach Zugabe von Kollagen und Natriumarachidonat nach Senkung der mittleren Blutglucose mittels kontinuierlicher subkutaner Insulininfusion während 10 Wochen bei 11 Diabetikern. Diese Patienten hatten jedoch eine ausgeprägte periphere Neuropathie.

PETERSON und Mitarbeiter (110) berichten dagegen nach Normalisierung der Blutglucosespiegel bei sieben Diabetikern von einem verzögerten Eintritt der sekundären Thrombozytenaggregation nach Zugabe von Epinephrin. GIUGLIANO et al. (56) gelang sogar innerhalb von 24 Stunden eine signifikante Reduktion der ADP-induzierten Aggregation durch normoglykämische Einstellung mit Hilfe eines Insulindosiergerätes.

Bei den gesunden Kontrollpersonen unserer Studie zeigten sich ausgeprägtere Schwankungen der Aggregationswerte zwischen den einzelnen Untersuchungen als

bei Diabetikern. Hierfür sind andere Faktoren wie Rauchen verantwortlich - direkt nach dem Rauchen einer Zigarette ist die Aggregation am stärksten - oder starke körperliche Anstrengung und psychischer Streß, die zu erhöhter Aggregation führen können (61).

6

ZUSAMMENFASSUNG

In letzter Zeit wurde der Einfluß einer veränderten Thrombozytenfunktion bei der Pathogenese diabetischer Gefäßkomplikationen zunehmend betont. Der Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktion und diabetischer Stoffwechsellage, vor allem der Effekt einer Einstellungsveränderung, sind jedoch noch weithin unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb dieses Problem nach Erarbeitung der Methodik und Abklärung von Einflußfaktoren anhand einer longitudinalen Diabetikerstudie genauer analysiert werden.

Zunächst wurden die Faktoren untersucht, die die Thrombozytenaggregation in vitro bei Gesunden beeinflussen. Dabei zeigte sich, daß die Plättchenreaktivität bei steigender Temperatur und zunehmendem Thrombozytenalter abnimmt und entscheidend von der Konzentration der zugegebenen Aggregantien abhängt. Weiterhin fand sich eine lineare Zunahme der Lichttransmission bei steigender Thrombozytenkonzentration. Veränderung der Blutabnahmetechnik sowie Probengewinnung von nüchternen Probanden im Gegensatz zu postprandialer Funktion resultierten ebenfalls in gesteigerter Thrombozytensensibilität.

Bei Vorversuchen zur Messung der Serumspiegel glykosylierten Albumins fand sich bei der affinitätschromatographischen Abtrennung des Albumins eine Abhängigkeit sowohl vom pH als auch von der NaCl-Konzentration des Elutionspuffers, und es konnte ein verändertes Elutionsprofil des glykosylierten Albumins im Vergleich zu nichtglykosyliertem nachgewiesen werden. Die Bildung des Reaktionsendprodukts 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) erwies sich als linear abhängig von der Albuminkonzentration der

Proben.

Bezüglich dieses Zusammenhangs zwischen glykosyliertem Serumalbumin (GSA) und HbA_1 ließ sich eine signifikante Korrelation nachweisen, ebenso zwischen GSA und der Serumglucosekonzentration.

Um das Verhalten dieser Parameter über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten, wurde eine Langzeitstudie mit zehn Diabetikern und zehn gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Zur Feststellung der Stoffwechsellage bei den Diabetikern wurden neben den postprandialen Glucosewerten die Serumspiegel der Langzeitparameter HbA_1 , glykosyliertes Albumin und glykosyliertes Gesamtprotein herangezogen.

Bei dreimaliger Messung pro Person in 8 - 12 wöchigen Zeitabständen lagen die Werte für glykosyliertes Albumin und Serumprotein sowie HbA_1 bei Diabetikern im Mittel signifikant höher als bei Normalpersonen. Ebenso zeigten Diabetiker eine signifikant erhöhte Thrombozytenaggregation im Vergleich zu Normalpersonen nach Zugabe von ADP, Kollagen und Arachidonsäure ohne Abhängigkeit von Auftreten oder Fehlen diabetischer Spätkomplikationen.

1. AGARWAL, K./PARKS, R./WIDNESS, J./SCHWARTZ, R.: Nonenzymatic Glycosylation of Erythrocytic Proteins in Normal and Diabetic Subjects. *Diabetes* 34: 251-255 (1985)
2. ANDREANI, D./KEEN, H./SQUADRITO, G.: Highlights from the International Symposium: Diabetes and its Late Complications: New Prospects. *Diabetologia* 23: 284-285 (1982)
3. ARDLIE, N./HAN, P.: Enzymatic Basis for Platelet Aggregation and Release: The Significance of the "Platelet Atmosphere" and the Relationship between Platelet Function and Blood Coagulation. *British Journal of Haematology* 26: 331-350 (1974)
4. DAILEY, A./RODINS, S./TANNER, M.: Reducible Components in the Proteins of Human Erythrocyte Membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 434: 51-57 (1976)
5. BARDOSA, J./SANER, B.: Do genetic factors play a role in the pathogenesis of diabetic microangiopathy? *Diabetologia* 27: 487-492 (1984)
6. DENSOUSSAN, D./LEVY-TOLEDANO, S./PASSA, P./CAEN, J./CANIVET, J.: Platelet Hyperaggregation and Increased Plasma Level of Von Willebrand Factor in Diabetics with Retinopathy. *Diabetologia* 11: 307-312 (1975)

7. BERKMAN, J./RIFKINS, H./ROSS, G.: The Serum Polysaccharides in Diabetic Patients with and without degenerative vascular disease. J. Clin. Invest. 32: 415-421 (1953)
8. DERN, M: Platelet Functions in Diabetes Mellitus. Diabetes 27: 342-349 (1978)
9. BETTERIDGE, D./ZAHAVI, J./JONES, N./SHINE, D./KAKKAR, V./GALTON, D.: Platelet function in Diabetes Mellitus in relationship to complications, glycosylated haemoglobin and serum lipoproteins. Europ. J. Clin. Invest. 11: 273-277 (1981)
10. BIERRY, H./RATHERY, F.: Diabete et Glycemie. C. R. Acad. Sci. 172: 244-246 (1921)
11. BILLS, T./SMITH, J./SILVER, M.: Metabolism of ^{14}C Arachidonic acid by human platelets. Biochim. Biophys. Acta 424: 303-324 (1976)
12. BLOODWORTH, J.: Endocrine Pathology: Endocrine Pancreas and Diabetes Mellitus. 2nd Edition 1982 Williams and Wilkins, Baltimore/London 631-721
13. DORN, G./FEINBERG, H.: Binding of Adenosine Diphosphate to intact human platelets. J. Physiol. 251: 803-816 (1975)
14. DORN, G.: Aggregation of blood platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversals. Nature 4032: 927-929 (1962)

15. BORN, G.: Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. Proceedings of the Physiological Society 126: 67-68 P (1962)
16. DREDDIN, K./ZIEMEN, M./DAUER, O./HERRMANN, W./SCHANDINN, L./SCHLOSSER U./ WINTERHAGEN, A./KRZYWANEC, H.: Time and Temperature dependent changes of ADP - and Collagen - induced and "spontaneous" Aggregation. Thrombosis Research 19: 621-638 (1980)
17. DREDDIN K./GRUN H./KRZYWANEC, H./SCHREMMER, W.: On the Measurement of Spontaneous Platelet Aggregation. The Platelet Aggregation Test III. Thrombos. Hämostas. (Stuttg.) 35: 669-691 (1976)
18. DUNN, H./HIGGINS, P.: Reaction of Monosaccharides with Proteins: Possible Evolutionary Significance. Science 213: 222-224 (1981)
19. DUNN, H.: Non-enzymatic glycosylation of protein: a form of molecular aging. Schweiz. med. Wochenschrift 111: 1503-1507 (1981)
20. DUNN, H.: Nonenzymatic Glycosylation of Protein: Relevance to Diabetes. Amer. J. Med. 70: 325-330 (1981)
21. DUNN, H./HANEY, D./KAMIN, S./GADRAY, K./GALLOP, P.: The Biosynthesis of Human Hemoglobin A1c. Slow Glycosylation of Hemoglobin in vivo. J. Clin. Invest. 57: 1652-1659 (1976)

22. DUNN, H./HANEY, D./GADDAY, K./GALLOP, P.: Further identification of the Nature and linkage of the carbohydrate in Hemoglobin A1c. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 67: 103-109 (1975)
23. CAHILL, G./ETZWILER, D./FREINKEL, N.: "Control and Diabetes." *New Engl. J. Med.* 294: 1004-1005 (1976)
24. CERICILLO, A./CURCIO, F./DELLO RUSSO, P./GUIGLIANO, D.: Non-enzymatic glycosylation reduces Antithrombin III Activity. *Thromb Haemostas.* 52: 363 (1984)
25. CHRISTIE, M./CATTLEN, P./FRITSCH, J./LAMMLE, B./BERGER, W./MARDET, W./DUCKERT, F.: The Contact Phase of Blood Coagulation in Diabetes Mellitus and in Patients with Vasculopathy. *Thromb. Haemostas.* 52: 221-223 (1984)
26. COHEN, M./URDANIVIA, E./SURMA, M./CIDOROWSKI, C.: Nonenzymatic Glycosylation of Basement Membranes. *Diabetes* 30: 367-371 (1981)
27. COLWELL, J./LOPES-VIRELLA, M./HALUSIKA, P.: Pathogenesis of Artherosclerosis in Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 4: 121-133 (1981)
28. COLWELL, J./NAIR, R./HALUSIKA, P./ROGERS, C./WIETSELL, A./SAGEL, J.: Platelet Adhesion and Aggregation in Diabetes Mellitus. *Metabolism* 28: 394-400 (Suppl 1) (1979)

29. COLWELL, J./SAGEL, J./CROOK, L./CHAMBERS, A./LAIMINS, M.: Correlation of Platelet Aggregation, Plasma Factor Activity and Megathrombocytes in Diabetic Subjects with and without Vascular Disease. *Metabolism* 26: 279-285 (1977)
30. COLWELL, J./HALUSKA, P./SARJI, K./LEVINE, J./SAGEL, J./NAIR, R.: Altered Platelet Function in Diabetes Mellitus. *Diab.* 25 (Suppl. 2): 826-831 (1976)
31. COLWELL, L./CHAMBERS, A./LAIMINS, M.: Inhibition of labile Aggregation-stimulating Substance (LASS) and Platelet Aggregation in Diabetes Mellitus. *Diabetes* 24: 684-687 (1975)
32. CONSTAM, G.: Sind die diabetische Angio- und Neuropathie vermeidbar? *Med. Klin.* 72: 695-702 (1977)
33. DAY, J./INGEDRETSSEN, C./INGEDRETSSEN, W./DAYNES, J./THORPE, S.: Nonenzymatic Glycosylation of Serum Proteins and Hemoglobin: Response to Changes in Blood Glucose Levels in Diabetic Rats. *Diabetes* 29: 524-527 (1980)
34. DAY, J./THORPE, S./DAYNES, J.: Nonenzymatically Glucosylated Albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum. *The J. of Biological Chemistry* 254: 595-597 (1979)
35. DAY, J./THORNBURG, R./THORPE, S./DAYNES, J.: Nonenzymatic Glycosylation of Rat Albumin. Studies in vitro and in vivo. *The J. of Biological Chemistry*: 254: 9394-9400 (1979)

36. DEMMEL, P.: Der Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die Thrombozytenfunktion des Diabetikers. Inaugural-Dissertation, München 1-83 (1983)
37. DOLHOFFER, R./WIELAND, O.: Improvement of the Thiobarbituric acid assay for serum glycosylprotein determination. Clin. Chim. Acta 112: 197-204 (1981)
38. DOLHOFFER, R./RENNER, R./WIELAND, O.: Different Behaviour of Haemoglobin A1a-c and Glycosyl-Albumin Levels During Recovery from Diabetic Ketoacidosis and Non-acidotic Coma. Diabetologia 21: 211-215 (1981)
39. DOLHOFFER, R./WIELAND, O.: Increased Glycosylation of Serum Albumin in Diabetes Mellitus. Diabetes 29: 417-422 (1980)
40. DOLHOFFER, R./WIELAND, O.: Glycosylation of Serum Albumin: Elevated Glycosyl-Albumin in Diabetic Patients. Febs Letters 103: 282-286 (1979)
41. DOLHOFFER, R./WIELAND, O.: Preparation and Biological Properties of Glycosylated Insulin. Febs Letters 100: 133-136 (1979)
42. DUPUY, E./GUILLAUSSEAU, P./GAUDEUL, P./KARTALIS, G./WILD, A./PASTUREAU, A./SORIA, C./MALBEC, D./DUPREY, J./LUDETZKI, J./CAEN, J.: Fonctions plaquettaires des diabétiques ayant une angiopathie. La Nouvelle Presse Médicale 8: 3123-3125 (1979)

43. EJARQUE, P./MARBLE, A./TULLER, E.: Proteins, Lipoproteins and Protein-Bound Carbohydrates in the Serums of Diabetic Patients. *Am. J. Med.* 221-230 (1959)
44. CLVING, L./CASPARIE, A./MIDDEMA, K./RUSSEHEN, C.: Plasma β -Thromboglobulin in diabetics with and without Microangiopathic Complications. *Diabetologia* 21: 160-161 (1981)
45. ENGERMANN, R./BLOODWORTH, J./NELSON, S.: Relationship of Microvascular disease in Diabetes to Metabolic Control. *Diabetes* 26: 760-769 (1977)
46. EWALD, U./KODDARI, M./VESSBY, B./TUVEMO, T.: Increased Platelet Aggregability in Diabetic Children: Relation to Serum Lipid and Fatty Acid Composition. *Diabetologia* 25: 382-385 (1983)
47. FERGUSON, J./MACKAY, N./PHILLIP, J./SUMNERED: Determination of platelet and fibrinogen half-life with (75 Se) selenomethionine: studies in normal and in diabetic subjects. *Clin. Science and Molecular Medicine* 49: 115-120 (1975)
48. FILES, J./MALPASS, T./YEE, E./RITCHIE, J./HARKER, L.: Studies of Human Platelet α - Granule Release in Vivo. *Blood*: 607-618 (1981)
49. FINDT P.: Nonenzymatic Browning Products: Physiologic Effects and Metabolic Transit in Relation to Chemical Structure a Review. *Diabetes* 31 (Suppl 3): 22-28 (1982)

50. FLOCKINGER, R./WINTERHALTER, K.: In vitro Synthesis of Hemoglobin A1c. Febs Letters 71: 356-360 (1976)
51. FOX, C./DARBY, S./IRELAND, J./SOENKSEN, P.: Blood glucose control and glomerular capillary basement membrane thickening in experimental diabetes. British Medical Journal 2: 605-607 (1977)
52. FRIEDMANN, M.: Chemically reactive and unreactive Lysine as an Index of Browning. Diabetes 31 (Suppl 3): 5-14 (1982)
53. FRITSCHI, J./CHRISTIE, M./LAMMLE, B./MARBET, G./BERGER, W./DUCKERT, F.: Platelet Aggregation, β -Thromboglobulin and PF 4 in Diabetes Mellitus and in Patients with Vasculopathy. Thromb. Haemostas. 52: 236-239 (1984)
54. GARCIA, M./McNAMARA, P./GORDON, T./KANDEL, W.: Morbidity and Mortality in Diabetics in the Framingham Population. Diabetes 23: 105-111 (1974)
55. GENISINI, G./ABBATE, R./FAVILLA, S./ e.a.: Changes of Platelet Function and Blood Clotting in Diabetes Mellitus. Thrombos Haemostas. 42: 983-993 (1979)
56. GIUGLIANO, D./MISSO, L./TIRELLI, A./COPPOLA, L./DI PINTO, P./TORELLA, R.: Platelet Aggregation after strict Metabolic Control. Diabetologia 23: 545 (1982)

57. GORDON, J.: Mechanism of platelet-collagen interaction. *Nature* 278: 13-14 (1979)
58. GRAGNOLI, G./TAGANELLI, I./SIGNORINI, A./TARLI, P./PAOLI, C.: Nonenzymatic Glycosylation of Serum Proteins as an Indicator of Diabetic Control. *Diabetologia* 22: 224 (1982)
59. GUTHROW, C./MORRIS, M./DAY, J./THORPE, S./BAYNES, J.: Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4258-4261 (1979)
60. HALUSHKA, P./LURIE, D./COLWELL, J.: Increased Synthesis of Prostaglandin-E-like Material by platelets from patients with Diabetes Mellitus. *New Engl. J. Med.* 297: 1306-1310 (1977)
61. HARRISON, M./COMMONS, P./MITCHELL, J.: The variability of human platelet aggregation. *J. of Artheroscler. Res.* 7: 197-204 (1967)
62. HAWKINS, R.: Smoking, Platelets and Thrombosis. *Nature* 236: 450-452 (1972)
63. HEATH, H./BRIDGEN, W./CANEVER, J./POLLOCK, J./HUNTER, P./KELSEY, J./BLOOM, A.: Platelet Adhesiveness and Aggregation in Relation to Diabetic Retinopathy. *Diabetologia* 7: 308-315 (1971)
64. HODGE, J.: Chemistry of Browning Reaction in Model Systems. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 1: 928-943 (1953)

65. HOLMQUIST, W./SCHROEDER, W.: A new N-Terminal Blocking Group Involving a Schiff Base in Hemoglobin A1c. *Biochemistry* 5: 2489-2503 (1966)
66. HUISMAN, T./DOZY, A.: Studies on the heterogeneity of Hemoglobin with oxidized Glutathione. *J. Lab. and Clin. Med.* 60: 302-319 (1962)
67. INTROZZI, P./BERNASCONI, C./DUSCARINI, L.: Serum Proteins, Lipids and Protein-Bound Carbohydrates in Vascular Complications of Diabetes Mellitus. *Acta Medica Scandinavica* 100: 47-58 (1958)
68. JACKSON, C./CREAVES, M./BOULTON, A. e. a.: Near-normal glycaemic control does not correct abnormal platelet reactivity in Diabetes Mellitus. *Clinical Science* 67: 551-555 (1984)
69. JAHNKE, K./REIS, H./HOCHLER, H.: Konservative Therapie und Prophylaxe der Macroangiopathie diabetica. *Med. Klin.* 71: 745-759 (1976)
70. JANKA, H./HAUPT, E./STANDL, E.: Gefäßkrankheiten bei Diabetes Mellitus. Mehnert/Schöffling, *Diabetologie in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag Stuttgart S. 405-429 (1984)
71. JONES, I./OWENS, D./WILLIAMS, S./RYDER, R. e. a.: Glycosylated Serum Albumin. *Diabetes Care* 6: 501-503 (1983)
72. JONES, R./PETERSON, C.: Hematologic Alterations in Diabetes Mellitus. *The American J. of Med.* 70: 339-352 (1981)

73. JONES, R./PARADISE, C./PETERSON, C.: Platelet Survival in Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes* 30: 486-489 (1981)
74. KALOFOUTIS, A./LEKAKIS, J.: Changes of Platelet Phospholipids in Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 21: 486-489 (1981)
75. KARPATKIN, S.: Studies on Human Platelet Glycolysis. Effect of Glucose, Cyanide, Insulin, Citrate and Contraction on Platelet Glycolysis, *J. Clin. Invest.* 46: 409-418 (1967)
76. KATTOVE, H./ALEXANDER, B.: The Effect of Cold on Platelets. I. Cold-induced Platelet Aggregation. *Blood* 38: 39-48 (1971)
77. KENNEDY, L./BAYNES, J.: Nonenzymatic glycosylation and the chronic complications of Diabetes. *Diabetologia* 26: 93-98 (1984)
78. KENNEDY, L./MCIL, T./CLDER, E./VARGHESE, M./MERIMEE, T.: Nonenzymatic Glycosylation of Serum and Plasma Proteins. *Diabetes* 31 (Suppl 3): 52-56 (1982)
79. KENNEDY, L./MCHL, T./RILEY, W./MERIMEE, T.: Nonenzymatically Glycosylated Serum Protein in Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 21: 94-98 (1981)
80. KENNEDY, L./MERIMEE, T.: Glycosylated Serum Protein an Hemoglobin A1 Levels to Measure Control of Glycemia. *Ann. Intern. Med.* 95: 56-58 (1981)

81. KENNEDY, L./MEHL, T./MERIMCE, T.: Nonenzymatically Glycosylated Serum Protein: Spurious Elevation due to free Glucose in Serum. *Diabetes* 29: 413-415 (1980)
82. KILO, CH./VOGLER, N./WILLIAMSON, J.: Muscle Capillary Basement Membrane Changes Related to Aging and to Diabetes Mellitus. *Diabetes* 21: 881-905 (1972)
83. KIM, H./KURUO, J.: Nonenzymatic Glycosylation of Human Plasma low Density Lipoprotein. Evidence for in vitro and in vivo Glycosylation. *Metabolism* 31: 348-353 (1982)
84. KUBISZ, P./ARADI, A./HOLAN, J./CRONBERG, S.: Investigations on Platelet Function in Diabetes Mellitus. *Haemostasis* 14: 347-353 (1984)
85. LEE, T./PINTAURO, S./CHICHESTER, C.: Nutritional and Toxicologic Effects of Nonenzymatic Maillard Browning. *Diabetes* 31 (Suppl 3): 37-46 (1982)
86. LINDER, D./GOODMAN, D.: Studies on the Mechanism of the Inhibition of Platelet Aggregation and Release induced by high levels of Arachidonate. *Blood* 60: 436-445 (1982)
87. LOTJENS, A./TE VELDE, A./v.d. VECN, C./v.d. MEER, J.: Glycosylation of Human Fibrinogen in vivo. *Diabetologia* 28: 87-89 (1985)
88. LYONS, T./KENNEDY, L.: Nonenzymatic Glycosylation of skin Collagen in patients with Type I (insulin dependent) Diabetes Mellitus and limited joint mobility. *Diabetologia* 28: 2-5 (1985)

89. MA, A./NAUGHTON, M./CAMERON, D.: Glycosylated plasma protein: a simple method for the elimination of interference by glucose in its estimation. Clin. Chim. Acta 115: 111-117 (1981)
90. MALONE, J./KNOX, G./HARVEY, C.: Sorbitol accumulation is altered Type I (insulin-dependent) Diabetes Mellitus. Diabetologia 27: 509-513 (1984)
91. MAILLARD, L.: Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie methodique. C. R. Acad. Sci. 154: 66-68 (1912)
92. MARBLE, A.: Late complications of Diabetes. Diabetologia 12: 193-199 (1976)
93. MARCUS, A: Platelet Function (First of three parts). The New Engl. J. Med. 280: 1213-1220 (1969)
94. MARSHALL, M.: Zur Pathogenese der Arteriopathien. Fortschr. Med. 98: 177-179 (1980)
95. Mc FARLAND, K./CATALANO, E./DAY, J./THORPE, S./DAYNES, J.: Nonenzymatic Glycosylation of Serum Proteins in Diabetes Mellitus. Diabetes 28: 1010-1013 (1979)
96. Mc LAREN, E./CULLEN, D./DROWN, M.: Coagulation Abnormalities in Diabetic Coma before and 24 hours after treatment. Diabetologia 17: 345-346 (1979)

97. MC MILLAN, D.: Changes in Serum Proteins and Protein-bound Carbohydrates in Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 6: 597-604 (1970)
98. Mc MILLAN, D./la PUMA, J.: Reduced Erythrocyte Deformability in Diabetes. *Diabetes* 27: 895-902 (1978)
99. Mc MILLAN, D.: Plasma Protein Changes, Blood Viscosity and Diabetic Microangiopathy. *Diabetes* 25 (Suppl 2): 858-864 (1976)
100. MEANS, G./CHANG, M.: Nonenzymatic Glycosylation of Proteins Structure and Function Changes. *Diabetes* 31 (Suppl 3): 1-4 (1982)
101. MILLER, J./GRAVALLESE, E./DUNN, H.: Nonenzymatic Glycosylation of Erythrocyte Membrane Proteins. *J. Clin. Invest.* 65: 896-901 (1979)
102. MONCADA, S./VANE, J.: Arachidonic Acid Metabolites and the Interactions between Platelets and Blood-Vessel Walls. *The new Engl. J. Med.* 300: 1142-1147 (1979)
103. MONNIER, V./CERAMI, A.: Nonenzymatic Browning in vivo: Possible Process for Aging of long-lived Proteins. *Science* 211: 491-493 (1981)
104. MONNIER, V./CERAMI, A.: Nonenzymatic Glycosylation and Browning in Diabetes and Aging. *Diabetes* 31 (Suppl 3): 57-63 (1982)

105. MUSTARD, J./PERRY, D./ARDLIE, N./PACKHAM, M.: Preparation of Suspension of washed Platelets from Humans. British J. of Haematology 22: 193-204 (1972)
106. MUSTARD, J./PACKHAM, M.: Platelets and Diabetes Mellitus. New Engl. J. Med. 27: 1345-1347 (1977)
107. O'HARE, J./TWOMEY, D./FERRIS, J./O'SULLIVAN, D.: Metabolic control, Hyperzension and Microvascular Complications independently affect Transcapilliary Escape of Albumin in Diabetes. Diabetologia 22: 391-392 (1982)
108. PACKHAM, M.: Standardization of Collagen: Consideration of Current Practices in Testing Collagen-Induced Aggregation. Throm. Haemostas. 52: 358-361 (1984)
109. PARVING, H.: Increased Microvascular Permeability to Plasma Proteins in short and longterm Juvenile Diabetics. Diabetes 25 (Suppl 2): 884-889 (1976)
110. PATTON, A./HILL, E.: Inactivation of Nutrients Heating with Glucose. Science 107: 68-69 (1948)
111. PAULSEN, E./Mc CLUNG, N./SADIO, H.: Some Characteristics of Spontaneous Platelet Aggregation in Young Insulin-dependent Diabetic Subjects. Hormone and Metabolic Research (Suppl. 11): 15-21 (1981)

112. PEERSCHKE, E./ZUCKER, M./GRANT, R./EGAN, J.:
Correlation between Fibrinogen Binding to Human
Platelets and Platelet Aggreability. *Blood* 55:
841-847 (1980)
113. PEERSCHKE, E./ZUCKER, M.: Fibrinogen Receptor
Exposure and Aggregation of Human Blood Pla-
telets produced by ADP and Chilling. *Blood* 57:
663-670 (1981)
114. FENSE, E./PANZRAM, G./PISSAREK, D./MCINNIOLD, J.,
e.a.: Qualität der Stoffwechselführung und
Angiopathie bei 100 Langzeitdiabetikern mit min-
destens 20-jähriger Krankheitsdauer. *Schweiz.
med. Wschr.* 103: 1125-1129 (1973)
115. PETERSEN, H./GORMSEN, J.: Platelet Aggregation
in Diabetes Mellitus. *Acta. Med. Scand.* 203:
125-130 (1978)
116. PETERSON, C./JONES, R./KOENIG, R./MELVIN,
E./LEHRMANN, M.: Reversible Hematologic Sequelae
of Diabetes Mellitus. *Annals of International
Medicine* 86: 425-429 (1977)
117. PETIT, L.: La réaction de Maillard dans les
industries de l'alimentation. *Industr. alim.
agr.* 81: 905-914 (1964)
118. PORTA, M./HILGARD, P./KOINER, E.: Platelet Shape
Change Abnormalities in Diabetic Retinopathy.
Diabetologia 18: 217-221 (1980)

119. PORTA, M.: Availability of Endothelial von Willebrand Factor and Platelet Function in Diabetic Patients Infused with a Vasopressin Analogue. *Diabetologia* 23: 452-455 (1982)
120. PRESTON, E./MARCOLA, D./WARD, J./PORTER, N./TIMPERLEY, W.: Elevated β -Thromboglobulin Levels and Circulating Platelet Aggregates in Diabetic Microangiopathy. *The Lancet* I: 238-240 (1978)
121. PUTNAM, F.: The Plasma Proteins. Structure, Function and Genetic Control. Academic Press New York, San Francisco, London (1975), 2nd Edition: 133-150
122. RASKIN, P.: Diabetic Regulation and its Relationship to Microangiopathy, *Metabolism* 27: 235-252 (1978)
123. RASKIN, P./PIETRI, A./UNGER, R./SHANNON, W.: The effect of diabetic control on the width of skeletal-muscle Capillary Basement membrane in Patients with Typ I Diabetes Mellitus. *The New Engl. J. Med.* 309: 1540-1551 (1983)
124. RODINS, S./DAILEY, A.: Age-related Changes in Collagen: The Identification of Reducible Lysine-Carbohydrate Condensation Products. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 48: 76-84 (1972)
125. ROSS, R./GLOMSET, J.: The Pathogenesis of Atherosclerosis:
Teil I : *New Engl. J. Med.* 295: 369-377 (1976)
Teil II: *New Engl. J. Med.* 295: 420-425 (1976)

126. SAGEL, J./COLWELL, J./CROOK, L./LAJTHY, M.: Increased Platelet Aggregation in Early Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine* 82: 733-738 (1975)
127. SALTMAIR, M./LADUZA, T.: Nonenzymatic Browning via the Maillard Reaction in Foods. *Diabetes* 31 (Suppl 3): 29-36 (1982)
128. SCHAFER, A./HANDIN, R.: The Role of Platelets in Thrombotic and Vascular Disease. *Progress in Cardio-Vascular Diseases* 22: 31-52 (1979)
129. SCHARF, R./SCHNEIDER, W.: Die Rolle der Blutplättchen bei Mikrozirkulationsstörungen. *Dtsch. med. Wschr.* 109: 306-313 (1984)
130. SCHLEICHER, E./GERDITZ, K./DOLHOFFER, R./REINDL, E./WICLAND, O./EDELHARDT, E. /HASLBECK, M./WALTER, H./KEMMLER, W./MEINERT, H.: Clinical Utility of Nonenzymatic Glycosylated Blood Proteins as an Index of Glucose Control. *Diabetes Care* 7: 548-556 (1984)
131. SCHLEICHER, E./WICLAND, O.: Specific Quantification by HPLC of Protein (Lysine) Bound Glucose in Human Serum Albumin and Other Glycosylated Proteins. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19: 81-87 (1981)
132. SCHLEICHER, E./SCHILLER, L./WICLAND, O.: Quantification of Lysine-bound Glucose of Normal and Diabetic Erythrocyte Membranes by HPLC Analysis of Furosine. *Biochem. Biophys. Res. Comp.* 99: 1011-1019 (1981)

133. SIESS, W./ROTH, P./WEDER, P.: Stimulated Platelet Aggregation, Thromboxane D2 Formation and Platelet Sensitivity to Prostacycline. *Thrombos. Haemostas (Stuttgart)* 45 (3): 204-207 (1981)
134. SIPERSTEIN, M.: Diabetic Microangiopathie and the Control of Blood Glucose. *The New Engl. J. Med.* 309: 1577-1579 (1983)
135. SIPERSTEIN, M./UNGER, R./MADISON, L.: Studies of Muscle Capillary Basement Membranes in Normal Subjects, Diabetic and Prediabetic Patients. *The J. of Clinical Investigation* 47: 1973-1999 (1968)
136. SPIRO, R.: Search for a Biochemical Basis of Diabetic Microangiopathy. *Diabetologia* 12: 1-14 (1976)
137. STEEN, V./HOLMSEN, H.: Inhibition of ADP-induced Responses in Human Platelets by Agents Elevating the Cyclic AMP Level: Comparison of Aggregation and Shape Change. *Thromb. Haemostas.* 52: 333-335 (1984)
138. STEVENS, V./ROUZER, C./MONNIER, V./CERAMI, A.: Diabetic cataract formation: Potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2918:2922 (1978)
139. STOUT, R.: Diabetes and Atherosclerosis - The Role of Insulin. *Diabetologia* 10: 141-150 (1979)

140. TAKAHASHI, R./MORITA, I./SAITO, Y./ITO, H./MUROTA, S.: Increased arachidonic acid incorporation into platelet phospholipids in Type II (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 26: 134-137 (1984)
141. TCHODROUTZKY, G.: Relation of Diabetic Control to Development of Microvascular Complications. *Diabetologia* 15: 143-152 (1978)
142. VOGT, D./SCHLEICHER, E./WICHLAND, O.: c-Amino-Lysine-Bound Glucose in Human Tissues obtained at Autopsy. *Diabetes* 31: 1123-1127 (1982)
143. VRACKO, R.: Basal Lamina Layering in Diabetes Mellitus. *Diabetes* 23: 94-104 (1974)
144. WAMHOFF, D./PANZRAM, G.: Einfluß von Insulin, Glukose und anderen Monosacchariden auf Plättchenfunktion. *Klin. Wschr.* 54: 1137-1141 (1976)
145. WARLOW, C./CORINA, A./OGSTON, D./DOUGLAS, A.: The Relationship between Platelet Aggregation and Time Interval after Venepuncture. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* 31: 133-141 (1974)
146. WEISS, H.: Platelet Physiology and Abnormalities of Platelet Function. *The New Engl. J. Med.* 293: 531-541 (1975)
147. WENCEL-DRAKE, J./FEINBERG, H.: ADP-induced DeplORIZATION of Human Platelet Membrane Potential. *Thromb. Haemostas.* 53: 75-79 (1985)

148. WIELAND, O./DOLHOFFER, R./SCHLEICHER, E.: Glycosylation of Hemoglobin and of Serum Albumin in Diabetes. International Congress Series, Nr. 500, Diabetes (Waldhäusl, WK, ed.): 721-727 (Oxford 1979)
149. WILLIAMS, S./DEVENNY, J./DITENSKY, M.: Micropinocytic ingestion of glycosylated albumin by isolated microvessels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2393-2397 (1981)
150. WILLIAMSON, J./GARDNER, R./BOYLAN, C./CARROLL, G. e.a.: Microrheologic Investigation of Erythrocyte Deformability in Diabetes Mellitus. Blood 65: 283-288 (1985)
151. WILLMS, B.: Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die Entwicklung von Spätkomplikationen des Diabetes. Münch. med. Wchschr. 119: 482-488 (1977)
152. WITZTUM, I./MAHONEY, E./DRANKS, M./FISCHER, M./ELAM, R./STEINBERG, D.: Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its Biologic Activity. Diabetes 31: 283-291 (1982)
153. YUC, D./MORRIS, K./McLENNAN, S./TURTLE, J.: Glycosylation of Plasma Protein and its Relation to Glycosylated Hemoglobin in Diabetes. Diabetes 29: 296-300 (1980).

Lebenslauf

Am 04.10.1958 wurde ich in Erlangen als Tochter der Eheleute Peter und Gertrud Smolka geboren. Von 1965 bis 1969 besuchte ich die Grundschule in Kötzing/Niederbayern und Cham/Oberpfalz, anschließend trat ich in das Neusprachliche Gymnasium in Cham über und wechselte 1973 an das Musische Gymnasium in Erlangen, wo ich 1976 das Abitur ablegte.

Das Medizinstudium begann ich im April 1977 in Heidelberg und wechselte zum Wintersemester 1977/78 nach Erlangen. Dort legte ich im März 1979 das Physikum und im März 1980 das Erste Staatsexamen ab. Ab Herbst 1980 führte ich das Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München weiter und begann im Dezember 1980 mit den Versuchen zur vorliegenden Arbeit, die im Herbst 1982 abgeschlossen wurden.

Das Zweite Staatsexamen bestand ich im März 1983 und absolvierte anschließend das Praktische Jahr am "Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier" in Frankreich. Den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich im Oktober und November 1984 ab.

Seit dem 01. Oktober 1985 bin ich als Assistenzärztin auf der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Evang. Krankenhauses in Lippstadt tätig.

Herrn Prof. Dr. Landgraf danke ich für die Überlassung des Themas und die stets hilfreiche und anregende Kritik.

Bei Frau Dr. M.M.C. Landgraf-Leurs möchte ich mich für die kritische Anleitung bedanken.

Herzlichen Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors, besonders Frau Sigrid Kammerer, für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Mit meinem Kollegen Tilmann Bock stellte ich den methodischen Teil der vorliegenden Arbeit fertig. Ich danke ihm für die harmonische Zusammenarbeit.

